

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA



VARIAÇÕES GENÉTICAS DO METABOLISMO DA
HOMOCISTEÍNA COMO BIOMARCADORES DE RISCO
CARDIOVASCULAR EM MULHERES COM ANTECEDENTES DE
DOENÇA HIPERTENSIVA DA GRÁVIDA

Helena Isabel Mendes da Maia

Curso de Mestrado em Doenças Metabólicas e Comportamentos Alimentares
Lisboa 2013

Esta dissertação foi aprovada pelo Concelho Científico da Faculdade de
Medicina da Universidade de Lisboa em reunião de (oportunamente indicada).

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA



VARIAÇÕES GENÉTICAS DO METABOLISMO DA
HOMOCISTEÍNA COMO BIOMARCADORES DE RISCO
CARDIOVASCULAR EM MULHERES COM ANTECEDENTES DE
DOENÇA HIPERTENSIVA DA GRÁVIDA

Helena Isabel Mendes da Maia

Orientador: Professor Doutor Manuel Pires Bicho, Laboratório de Genética,
Centro do Metabolismo e Endocrinologia (CME) da Faculdade de Medicina da
Universidade de Lisboa e Instituto Rocha Cabral,

Todas as afirmações contidas neste trabalho são da exclusiva responsabilidade
do candidato, não cabendo à Faculdade de Medicina da Universidade de
Lisboa qualquer responsabilidade.

Curso de Mestrado em Doenças Metabólicas e Comportamento Alimentar
Lisboa 2013

Artigos / Apresentações realizadas durante o trabalho

Artigos:

Alterações do Metabolismo da Homocisteína e Folatos como biomarcadores de risco da doença Hipertensiva da gravidez. Travaux de Laboratoire, Institut Rocha Cabral –Lisbonne, Tome LI, vol II 2011.

The polymorphism C677T of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) may influence the development of hypertension in pregnancy. Revista Portuguesa de Hipertensão e Risco Cardiovascular 2013; vol 34, 27 (Abstract).

The polymorphism C677T of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) may increase risk for futures higher blood pressure in women with previous hypertension in pregnancy. Pregnancy Hypertension, An International Journal of Women's Cardiovascular Health, 2013; vol 3, 2, 69 (Abstract).

A Epigenética da Pré-eclâmpsia e o seu papel nas doenças cardiovasculares: Uma Revisão. Revista Portuguesa de Hipertensão e Risco Cardiovascular 37, 12-14, 2013.

Comunicações:

The polymorphism C677T of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) may influence the development of hypertension in pregnancy. 7º Congresso Português de Hipertensão e Risco Cardiovascular Global 2013 (oral).

The polymorphism C677T of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) may increase risk for futures higher blood pressure in women with previous hypertension in pregnancy. International Society for the study of Hypertension in Pregnancy, ISSHP European Congress, 12-14 June 2013- Tromsø, Norway (poster).

Índice

Agradecimentos	1
Glossário.....	3
Figuras	6
Quadros	7
Gráficos.....	14
RESUMO	15
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Doença Hipertensiva da Grávida	19
1.2 A Epigenética da Doença Hipertensiva da Grávida	22
1.3 O metabolismo da homocisteína - Vias de Transmetilação e Transulfuração	25
1.4 Relação entre o metabolismo da Homocisteína e a ingestão de ácido fólico, vitaminas do complexo B e colina.....	34
1.5 Redefinição actual da Doença Hipertensiva da Grávida	40
2. OBJECTIVOS	45
3. METODOLOGIA	46
3.1 População em estudo.....	46
3.2 Materiais e métodos.....	47
3.2.1 Extracção de DNA	47
3.2.2 PCR	47
3.2.3 Gel de agarose	51
3.3 Tratamento de dados e métodos estatísticos.....	55
4. RESULTADOS.....	56
4.1 Dados demográficos	56
4.2 Pré disposição genética para a Doença hipertensiva da gravidez na população portuguesa	57
4.2.1 Caracterização da amostra total	57
4.2.2 Genótipo da redutase do metiletilenotetrahydrofolato (MTHFR C677T) e Frequência de HTA.....	59

4.2.3	Genótipo da redutase do dihidrofolato (DHFR del19 pb intrão 1) e Frequência de HTA.....	61
4.3.4	Genótipo da Beta Sintase da Cistationina (C β S ins68 pb exão 8) e Frequência da HTA.....	63
4.2.5	Genótipo da catecol-O-metiltransferase (COMT Val158Met) e Frequência da HTA.....	65
4.2.6	Frequências Genóticas nas mulheres grávidas hipertensas de acordo com a classificação actual da Doença hipertensiva da gravidez (acima e abaixo das 34 semanas)	67
4.3	Pré disposição genética para a evolução da Doença hipertensiva da gravidez para Doença cardiovascular futura.....	70
4.3.1	Caracterização da amostra	70
4.3.2	Comparação do IMC antes e depois da gravidez	74
4.3.3	Estudo dos parâmetros de variação contínua	77
4.3.3.1	Estudo da influência genética do polimorfismo da redutase do metiletilenotetrahydrofolato (MTHFR C677T) nos parâmetros de variação contínua.....	78
4.3.3.2	Estudo da influência genética do polimorfismo da redutase do dihidrofolato (DHFR del19 pb intrão 1) nos parâmetros de variação contínua.....	82
4.3.3.3	Estudo da influência genética do polimorfismo da Beta Sintase da Cistationina (C β S ins68 pb exão 8) nos parâmetros de variação contínua.....	86
4.3.3.4	Estudo da influência genética do polimorfismo da catecol-O-metiltransferase (COMT Val158Met) nos parâmetros de variação contínua.....	89
5.	DISCUSSÃO	94
6.	CONCLUSÕES	102
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

Agradecimentos

Começo por agradecer a todas as pessoas que tornaram este trabalho possível, dedicando o seu tempo e apoio no aperfeiçoamento do mesmo, principalmente à Professora Doutora Cláudia Marinho, minha co-orientadora, professora, mulher, mãe e amiga que tanto me ajudou a impulsionar este trabalho, uma pessoa cativante, sempre com um sorriso nos lábios, optimista, de uma grande força, uma lutadora até ao fim.

Gostaria de agradecer em particular ao meu orientador, o Professor Doutor Manuel Bicho, não só pelos seus ensinamentos mas também pela sua compreensão, disponibilidade, apoio, amizade e sobretudo interesse e preocupação.

À Dra. Alda Pereira da Silva e Andreia Matos pela incansável ajuda sempre que precisei quer na organização da base de dados quer na análise estatística. A todas as pessoas que integram o Laboratório de Genética partilhando o seu espaço. E aos meus amigos André, Constança, David e Joana pela amizade e disponibilidade.

Por fim às pessoas mais importantes da minha vida:

À mãe Cidália pelo amor e apoio incondicional e paciência que sempre teve para me “aturar”.

Ao pai Gonçalo pela ajuda proporcionando que tenha sido sempre “tudo” possível.

À minha avó Leonor, avô Manuel, mano Diogo e a todos que já não se encontram entre nós mas que sei que continuam a guiar-me.

À minha bebé Leonor que me acompanhou neste trabalho desde o seu primeiro dia na minha barriga, fonte de inspiração e força.

E finalmente ao meu Sol pela luz que me traz todos os dias.

A todos o meu mais profundo e sincero obrigada!

Glossário

A

ACIU - Atraso do crescimento intrauterino

B

BHMT - Betaína-homocisteína metiltransferase

C

C β S - β -sintetase da cistationina

COMT - Catecol-O-metiltransferase

D

DCV - Doenças cardiovasculares

DHFR - Redutase do dihidrofolato

DNA - Ácido desoxirribonucleico do inglês Desoxiribonucleic acid

DTN - Defeitos do tubo neural

F

FAD - Dinucleotídeo de flavina e adenina

FIGLU - Ácido formiminoglutâmico

G

GR- Redutase do glutationo

H

HCys - Homocisteína

HDP - Doenças hipertensivas da grávida

HELLP – Hemolysis Liver Low Platelet Syndrome

HHcys - Hiperhomocisteinémia

HTA - Hipertensão arterial

I

IG - Idade gestacional

IMC - Índice de massa corporal

IUGR - Intrauterine growth restriction

M

MS - Sintetase da metionina

MTHF - Metilenotetrahidrofolato

MTHFR - Reductase do metilenotetrahidrofolato

N

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida

NADP+ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

O

OR- Odds ratio

P

Pb - Pares de bases

PCR - Reacção em cadeia da polimerase do inglês polymerase chain reaction

PCR-RFLP - Reacção em cadeia da polimerase - Polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição do inglês Restriction Fragment Length Polymorphism-polymerase chain reaction

PLGF- Factor de crescimento placentário, do inglês Placental Growth factor

PLP - 5'-fosfato de piridoxal

R

RNA – Ácido ribonucleico

S

SAM - S-adenosilmetionina

SH - Grupos Sulfidrílo

T

tHcy - Homocisteína plasmática total

tCys - Cisteína plasmática total

Figuras

Figura 1 - Esquema hierárquico do desenvolvimento de hipertensão na prole de mães com desnutrição durante a gestação por exposição fetal ao cortisol

Figura 2 - Vias de metabolização da homocisteína

Figura 3 - Absorção, transformações e consequências da mal-absorção do Ácido fólico

Figura 4 - Metabolismo da Homocisteína

Figura 5 - Modelo da definição extensiva da Pré-eclâmpsia baseado nos biomarcadores derivados da placenta (PLGF, S-FLT)

Figura 6 - Esquema representativo da técnica de PCR

Figura 7 - Fotografia do gel de agarose (DHFR)

Figura 8 - Fotografia do gel de agarose (C β S)

Quadros

Quadro 1- Detalhes da técnica PCR para detecção dos polimorfismos genéticos MTHFR, DHFR, CβS e COMT

Quadro 2- Características do gel de agarose e perfis após análise de restrição dos polimorfismos genéticos MTHFR, DHFR, CβS e COMT

Quadro 3- Distribuição da população das mulheres grávidas

Quadro 4- Caracterização da população das mulheres grávidas normotensas e hipertensas segundo a idade gestacional (\leq e $>$ 34 semanas de gestação)

Quadro 5- Frequências genóticas e alélicas da MTHFR nos grupos das mulheres grávidas normotensas e grávidas hipertensas

Quadro 6- Risco relativo para a patologia associado ao polimorfismo da MTHFR

Quadro 7- Frequências genóticas e alélicas da DHFR nos grupos das mulheres grávidas normotensas e grávidas hipertensas

Quadro 8- Risco relativo para a patologia associado ao polimorfismo da DHFR

Quadro 9- Frequência genóticas e alélicas da C β S nas mulheres normotensas e hipertensas

Quadro 10- Risco relativo para a patologia associado ao polimorfismo da C β S

Quadro 11- Frequências genóticas e alélicas da COMT nos grupos das mulheres grávidas normotensas e hipertensas

Quadro 12- Risco relativo para a patologia associado ao polimorfismo da COMT

Quadro 13- Distribuição das mulheres grávidas hipertensas estudadas para cada polimorfismo segundo a idade de gestação (\leq 34 semanas e $>$ 34 semanas)

Quadro 14- Distribuição dos genótipos da MTHFR segundo a idade de gestação (\leq 34 semanas e $>$ 34 semanas) nas mulheres grávidas hipertensas do grupo dos casos

Quadro 15- Distribuição dos genótipos da DHFR segundo a idade de gestação (\leq 34 semanas e $>$ 34 semanas) nas mulheres grávidas hipertensas do grupo dos casos

Quadro 16- Distribuição dos genótipos da C β S segundo a idade de gestação (\leq 34 semanas e $>$ 34 semanas) nas mulheres grávidas hipertensas do grupo dos casos

Quadro 17- Distribuição dos genótipos da COMT segundo a idade de gestação (\leq 34 semanas e $>$ 34 semanas) nas mulheres grávidas hipertensas do grupo dos casos

Quadro 18- Frequência da hipertensão nos casos (durante e após a gravidez) e controlos (Grupo Peso)

Quadro 19- Comparação da hipertensão arterial ao fim de 6 anos após a gravidez entre mulheres sem pré-eclâmpsia e com pré-eclâmpsia prévia (PA \geq 140/90 mmHg)

Quadro 20- Distribuição dos casos e controlos segundo o IMC e Idade

Quadro 21- Distribuição do Índice de Massa Corporal após a gravidez nos casos e controlos (Grupo Peso)

Quadro 22- Distribuição das mulheres normotensas e hipertensas (casos e controlos Grupo Peso) após a gravidez

Quadro 23- Distribuição da população das mulheres (casos) por Índice da massa corporal (IMC)

Quadro 24- Distribuição da amostra em relação ao IMC pré e pós gravídico

Quadro 25- Distribuição das mulheres normotensas e hipertensas (casos) segundo o IMC pré gravídico e IMC pós gravídico

Quadro 26- Distribuição das mulheres normotensas em relação ao IMC pré e pós gravídico

Quadro 27- Distribuição das mulheres normotensas em relação ao IMC pré e pós gravídico

Quadro 28- Biomarcadores circulantes e IMC das mulheres normotensas e hipertensas dos dois grupos (casos e controlos)

Quadro 29- Concentração de MPO no polimorfismo MTHFR nas mulheres previamente normotensas e nas hipertensas durante a gravidez

Quadro 30- Biomarcadores circulantes das mulheres normotensas e hipertensas na MTHFR (CC+CT)

Quadro 31- Parâmetros antropométricos das mulheres normotensas e hipertensas na MTHFR (CC+CT)

Quadro 32- Pressão diastólica e sistólica nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas no genótipo TT da MTHFR

Quadro 33- Pressão diastólica e sistólica nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas nos genótipos CC+CT da MTHFR

Quadro 34: Frequência dos genótipos CC, CT e TT da MTHFR nas normotensas e hipertensas ao fim de 6 anos após a gravidez

Quadro 35- Biomarcadores circulantes das mulheres normotensas e hipertensas na DHFR (genótipos Ins/ins+Ins/del)

Quadro 36- Parâmetros antropométricos das mulheres normotensas e hipertensas na DHFR (genótipos Ins/ins+Ins/del)

Quadro 37- Parâmetros bioquímicos das mulheres normotensas e hipertensas na DHFR (genótipo Del/del)

Quadro 38- Parâmetros antropométricos das mulheres normotensas e hipertensas na DHFR (genótipo Del/del)

Quadro 39- Pressão diastólica e sistólica nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas nos genótipos Ins/ins + Ins/del da DHFR

Quadro 40- Pressão diastólica e sistólica nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas no genótipo Del/del da DHFR

Quadro 41- Biomarcadores circulantes das mulheres normotensas e hipertensas na C β S (genótipo -/-)

Quadro 42- Parâmetros antropométricos das mulheres normotensas e hipertensas na C β S (genótipo -/-)

Quadro 43- Biomarcadores circulantes das mulheres normotensas e hipertensas na C β S (genótipo +/-)

Quadro 44- Parâmetros antropométricos das mulheres normotensas e hipertensas na C β S (genótipo +/-)

Quadro 45- Pressão diastólica e sistólica nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas no genótipo -/- da C β S

Quadro 46- Pressão diastólica e sistólica nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas no genótipo +/- da C β S

Quadro 47- Parâmetros bioquímicos das mulheres normotensas e hipertensas na COMT (genótipos HH+HL)

Quadro 48- Parâmetros antropométricos das mulheres normotensas e hipertensas na COMT (genótipos HH+HL)

Quadro 49- Parâmetros bioquímicos das mulheres normotensas e hipertensas na COMT (genótipo LL)

Quadro 50- Parâmetros antropométricos das mulheres normotensas e hipertensas na COMT (genótipo LL)

Quadro 51- Pressão diastólica e sistólica nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas nos genótipos HH + HL da COMT

Quadro 52- Pressão diastólica e sistólica nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas no genótipo LL da COMT

Quadro 53- Comparação dos parâmetros de variação contínua das mulheres hipertensas \leq e $>$ das 34 semanas de gestação

Gráficos

Gráfico I- Representação da frequência genotípica da MTHFR nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas

Gráfico II- Representação da frequência genotípica da DHFR nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas

Gráfico III- Representação da frequência genotípica da C β S nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas

Gráfico IV- Representação da frequência genotípica da COMT nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas

Gráfico V- Concentração de MPO nas mulheres grávidas normotensas e nas hipertensas (genótipos CC+CT)

RESUMO

Introdução: A Hiperhomocisteinémia (HHcys) parece estar geralmente associada a um risco aumentado não só para doença hipertensiva da grávida bem como complicações a longo termo para as doenças cardiovasculares. Os resultados dos vários estudos são contraditórios pelo que é importante confirmar com estudos de variação genética.

Objectivos: Estudo da predisposição genética para a doença hipertensiva da gravidez e evolução para a doença cardiovascular futura baseada na variação polimórfica dos enzimas das vias de metabolização da Homocisteína e utilização da SAM.

Materiais e Métodos: Estudo caso-controlo de uma amostra populacional de 380 mulheres, com um subgrupo de 170 mulheres que tiveram doença hipertensiva da gravidez estudadas após 2-16 anos do parto com idades compreendidas entre os 20 e 35 anos.

Estudaram-se os polimorfismos genéticos (SNP e in/del). A amplificação dos genes foi feita por PCR (polimerase chain reaction). Para o tratamento dos resultados foi utilizado o programa SPSS® 20.0.

Resultados: Relativamente à predisposição genética para a doença hipertensiva da grávida apenas o genótipo TT do polimorfismo da MTHFR se revelou protector do aparecimento da doença hipertensiva da grávida ($p < 0,004$).

O excesso de peso e a obesidade em particular são factores de risco para a doença cardiovascular futura mais acentuadamente nas mulheres que foram hipertensas durante a gravidez.

Existe ainda uma predisposição genética para a doença cardiovascular futura demonstrada através de parâmetros antropométricos, metabólicos e celulares mais alterados em determinados genótipos nas mulheres com doença hipertensiva da grávida em particular os genótipos CC + CT da MTHFR.

Conclusões: Os resultados deste estudo poderão estabelecer uma prevenção personalizada da doença cardiovascular futura das mulheres com história prévia de hipertensão da gravidez. O diagnóstico precoce destas pacientes poderá evitar, o aparecimento de doença cardiovascular futura nas suas manifestações clínicas mais complexas.

Palavras-chave: Pré-eclâmpsia, doença hipertensiva da gravidez, homocisteína, polimorfismos genéticos.

ABSTRACT

Introduction: Hyperhomocysteinemia is in general associated with an increased risk for hypertensive disease of pregnancy. Results of several studies are contradictory. Studies of genetic variation can help to solve this problem.

Objective: The study of predisposition for pregnancy hypertensive disease and evolution for hypertension in the future, as the role of genetic polymorphisms of some enzymes of metabolic pathways of homocysteine (circulating biomarker of cardiovascular disease) and utilization of SAM.

Design: A sample population of 380 women, with a subgroup of 170 women who had hypertensive disease of pregnancy and studied 3-6 years after birth, aged between 20 and 35 years old.

Genetic polymorphisms (SNP and in/del) were studied by PCR (polymerase chain reaction). Statistical analysis was performed by SPSS ® 20.0.

Results: The genotype TT of MTHFR is protective for the development of hypertensive disease of pregnancy ($p < 0.004$).

Overweight and obesity are probably risk factors for the development of cardiovascular disease more evidenced in women previously hypertensive during pregnancy. There is also a genetic predisposition for future cardiovascular disease in those women based on variation of antropometric, metabolic and cellular parameters in particular for carriers of CC+CT genotypes of MTHFR.

Conclusions: In perspective, the expected results can help to establish a personalized prevention of future cardiovascular disease for women with a history of hypertension of pregnancy.

Keywords: *Preeclampsia, hypertension disease of pregnancy, homocysteine, genetic polymorphisms.*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença Hipertensiva da Grávida

O termo pré-eclâmpsia refere-se à ocorrência de hipertensão (>140/90 mmHg) e proteinúria depois da vigésima semana de gestação em mulheres que anteriormente eram normotensas e sem proteinúria¹. A sua pré-disposição está associada a gravidezes múltiplas (múltipara), com acompanhamento ginecológico/ obstétrico deficiente, a história familiar, hipertensão, doença renal pré existente e diabetes. Sendo esta situação tão comum, que ocorre em aproximadamente 5% das gravidezes na Europa e Estados Unidos da América². Em Portugal a prevalência é de 6% de mulheres com disfunções hipertensivas durante a gravidez ou puerpério, entre as quais 1,5% com hipertensão crónica, 2,5% com hipertensão na gravidez, 1,4% com pré-eclâmpsia, 0,2% com pré-eclâmpsia sobreposta, 0,1% com eclâmpsia e 0,1% com síndrome HELLP³. A proteinúria é um importante sinal indicativo de uma situação de pré-eclâmpsia e é definida como uma concentração de proteína \geq 300 g/l na urina de 24h⁴. As doenças hipertensivas da grávida (HDP), em particular a pré-eclâmpsia e a eclâmpsia, são a maior causa de morte materna do mundo⁴. Em geral, as mulheres com pré-eclâmpsia não sentem alterações significativas até a condição se tornar grave, o que potencia o aumento do risco de mortalidade. Uma pressão diastólica entre 90 e 110 mm Hg é um marcador indicativo de uma pré- eclâmpsia ligeira⁵.

A detecção precoce é essencial para estabelecer o diagnóstico e o tratamento atempado da eclâmpsia grave. Por vezes, a pré-eclâmpsia ligeira progride muito rapidamente, e sem aviso, para pré-eclâmpsia grave e eclâmpsia fulminante, o que se torna muito perigoso quer para a mãe quer para o feto⁵. Assim, o rastreio da pré-eclâmpsia deve ser realizado em todas as mulheres na consulta pré-natal⁵. Esta patologia da grávida encontra-se associada à redução do fluxo sanguíneo da placenta, o que resulta em hipóxia, uma situação em que existe diminuição da pressão de oxigénio e que pode causar lesões cerebrais graves e deficiência mental ou física, atraso no crescimento intra-uterino e em casos graves, nascimento de um feto morto⁵. Considera-se a existência de uma forte associação entre complicações na gravidez, em particular a restrição do crescimento intrauterino (ACIU) e a pré-eclâmpsia com a doença cardiovascular futura da mãe e nos últimos anos, igualmente ao conceito de programação fetal e à determinação de maior risco futuro do feto para a hipertensão e aterosclerose na idade adulta^{6,7}.

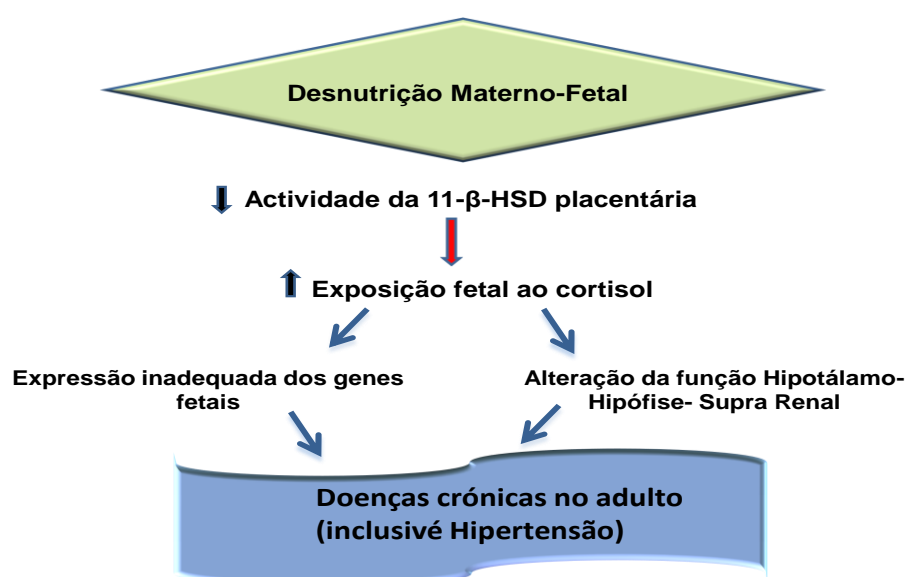


Figura 1- Esquema hierárquico do desenvolvimento de hipertensão na prole de mães com desnutrição durante a gestação por exposição fetal ao cortisol (adaptado de Bomfim A.S *et al*, 2005)⁸

A pré-eclâmpsia possui muitos factores de risco comuns às doenças cardiovasculares tais como a insulino-resistência, defeitos na coagulação, resposta inflamatória aumentada, tendo o stresse oxidante associado (que desempenha um papel importante na aterosclerose), contribuindo este para a disfunção das células endoteliais que revestem a parede dos vasos sanguíneos levando à lesão endotelial⁶. Podendo este também ligar a perfusão placentar diminuída na pré-eclâmpsia à resposta materna através desta disfunção endotelial e de danos vasculares⁶. Assim, considera-se provável a existência de uma associação estrita entre as complicações da gravidez e o risco de doença cardiocascular futura⁶.

Mulheres que tiveram partos múltiplos (múltiparas) têm um índice de risco duas vezes superior de doença isquémica cardíaca relativamente às mulheres primíparas. Por outro lado, existem evidências de que mulheres que tiveram uma gravidez com complicações têm um maior risco de doenças cardiovasculares em idades mais precoces quando comparadas com as que tiveram gravidezes sem complicações⁶.

Actualmente, considera-se cada vez mais que a pré-eclâmpsia é uma síndrome materno-fetal com vários factores predisponentes tanto genéticos como ambientais, que convergem entre si para uma “situação final” com características semelhantes⁹ (figura 1).

Nos últimos anos, crescentes evidências têm reforçado a ideia de que a ocorrência de distúrbios em períodos críticos do desenvolvimento fetal podem

determinar alterações permanentes ou de longo prazo na fisiologia ou morfologia de um determinado órgão¹⁰. O conceito de “programação fetal” sugere que o feto pode ser programado durante o desenvolvimento uterino para desenvolver doenças na idade adulta, sendo discutido como uma das chaves para entender a origem de algumas doenças cardiovasculares¹¹. A desnutrição pré-natal é o modelo mais extensamente estudado de programação fetal de doenças cardiovasculares, em especial a hipertensão arterial. De acordo com esta teoria, alterações no estado nutricional materno, reflectidas no baixo peso à nascença e na exposição fetal ao cortisol, seriam a base para o desenvolvimento de hipertensão arterial e aterosclerose coronária na idade adulta¹².

“A pré-eclâmpsia é uma doença que acarreta risco de vida durante a gravidez, sendo uma das principais causas de mortalidade materna a nível mundial”¹³.

1.2 A Epigenética da Doença Hipertensiva da Grávida

A complexidade dos processos envolvidos na interacção materno-fetal não fazem da investigação dos genes de susceptibilidade uma investigação facilitada, embora existam evidências do envolvimento de uma base genética¹³. Estudos retrospectivos recentes, sugeriram que a variabilidade genética, nomeadamente, no sistema renina-angiotensina poderia ser um dos factores de risco para a disfunção vascular ao nível placentar. Os mecanismos imunológicos tal como a tolerância imunológica parecem também desempenhar um papel fundamental¹³.

Recentemente, a importância da epigenética e o “imprinting” relacionados com o crescimento do trofoblasto bem como com o desenvolvimento fetal têm tido grande destaque¹³. No entanto, os mecanismos fisiopatológicos/genéticos subjacentes continuam por esclarecer. Intolerância imunitária, disfunção endotelial e aumento do stresse oxidante parecem contribuir significativamente para a etiologia da doença, sendo que todos estes componentes podem ter implicações genéticas⁶.

A Epigenética é definida como o estudo das mudanças no fenótipo ou expressão dos genes causada por outros mecanismos que não sejam as sequências do DNA¹⁴.

A Epigenética tem vindo a desenvolver-se muito rapidamente nos últimos anos. Sabe-se que factores epigenéticos têm um papel preponderante no funcionamento e desenvolvimento da placenta. Desta forma pensa-se haver um grande papel na susceptibilidade genética para a pré-eclâmpsia¹⁵.

Cada vez mais é sugerido que os factores ambientais podem influenciar o desenvolvimento fetal no desenvolvimento de doenças crónicas tão bem conhecidas como a diabetes, cancro, obesidade, doenças cardiovasculares e não só¹⁶. Assim sendo a pré-eclâmpsia deve ser considerada de origem multifactorial e não só multigénica¹⁷.

Na modificação epigenética estão envolvidos mecanismos como a metilação do DNA, regulação do metabolismo do RNA e a modificação pós-traducional (acetilação) das histonas podendo estes mecanismos epigenéticos estar ligados à patogénese da pré-eclâmpsia e ao atraso do crescimento intrauterino (ACIU)¹⁸.

Os factores ambientais (exposição a metais, disruptores endócrinos) podem interferir no desenvolvimento da placenta e na sua epigenética originando consequências para a mãe e para o feto relativamente ao aumento da sua susceptibilidade para o aparecimento de doenças acima descritas, em particular de doenças cardiovasculares, nas suas vidas futuras¹⁵. Existem fortes evidências sugerindo que mulheres com história de gestações pré-eclâmplicas têm maior risco de hipertensão crónica na vida adulta^{7,19}.

A Epigenética descreve modificações funcionais de genes que não têm alterações na sequência dos seus nucleótidos. Certas fases de desenvolvimento de doenças estão associadas à reprogramação epigenética²⁰.

A perda de “imprinting” genómico tem sido associada ao desenvolvimento de inúmeras doenças nomeadamente a pré-eclâmpsia e ao atraso do crescimento intrauterino (ACIU)¹⁸. Estudos epidemiológicos demonstraram que indivíduos pequenos à nascença têm um risco aumentado em adultos para várias doenças tais como obesidade, síndrome, metabólica, diabetes tipo 2, doença coronária, enfarte, e osteoporose¹⁸. Portanto pensa-se que os mecanismos epigenéticos estão de facto envolvidos no desenvolvimento da pré-eclâmpsia e, consecutivamente, no desenvolvimento de doenças cardiovasculares futuras na mulher²¹.

O progresso dos conhecimentos da epigenética da pré-eclâmpsia em curso e os estudos já realizados indicam que diferentes genes em diferentes populações ou doenças tomam lugar em pontos distintos convergindo como já referido para uma “condição comum”²².

Sabe-se que a dieta tem um papel muito importante e participa na metilação do DNA através da via externa que é a alimentação e da via interna ou seja através do metabolismo intermediário essencialmente os da transmetilação e transsulfuração, sendo que uma dieta deficiente ou em excesso pode interferir neste processo¹⁸.

1.3 O metabolismo da homocisteína - Vias de Transmetilação e Transsulfuração

A homocisteína (HCys) é um aminoácido com grupo SH (sulfidrílo), formado exclusivamente a partir da metionina proveniente da dieta alimentar ou do catabolismo das proteínas contendo este aminoácido²³.

O metabolismo da homocisteína envolve duas vias metabólicas diferentes: a via de metilação e a via de transsulfuração. A via de metilação ocorre principalmente em jejum envolvendo o catabolismo da metionina por transferência do grupo metilo, com formação sequencial de S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosil-homocisteína e homocisteína através do ciclo da metionina (figura 2). O grupo metilo libertado pela SAM poderá ser doado a vários substratos tais como proteínas, DNA ou fosfolípidos. O metabolismo da homocisteína (HCys) permite estabelecer uma ligação entre o ciclo da metionina e o ciclo do folato (figura 2). Na maioria dos tecidos e células, a principal ou única via de conversão da homocisteína em metionina ocorre através da transferência de um grupo metilo fornecido pelo 5-metiltetraidrofolato para a homocisteína, reacção catalizada por um enzima dependente da vitamina B12, a metionina sintase (MS). Um dos produtos desta reacção é a metionina que entrará num novo ciclo de doação de grupo metilo

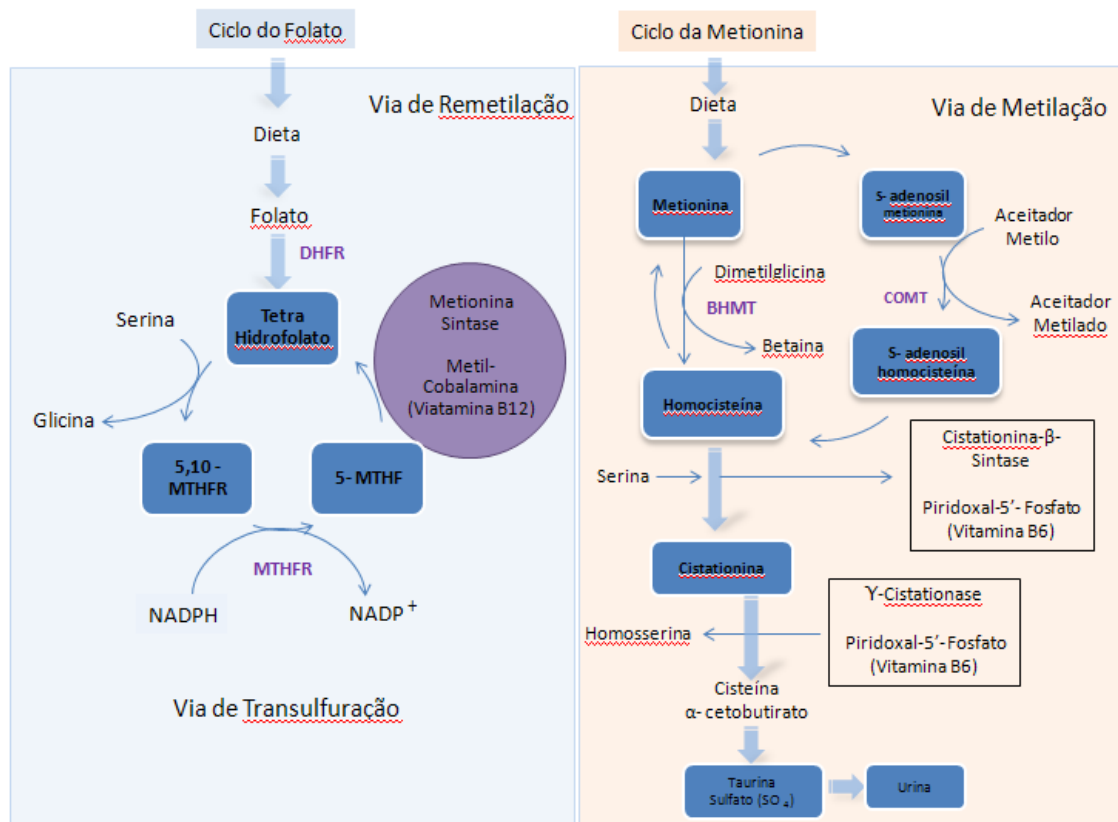
como descrito anteriormente (figura 2). Outro produto da reacção catalizada pela MS, o tetrahydrofolato, irá ser reconvertido a 5-metiltetrahydrofolato através do ciclo de folato, onde a conversão de 5,10-metilenotetrahydrofolato a 5-metiltetrahydrofolato é catalizada pelo enzima dependente de FAD, reductase do metilenotetrahydrofolato (MTHFR)²⁴.

A via de transulfuração, que ocorre em situações de sobrecarga de metionina, envolve o catabolismo da homocisteína a sulfato, que será posteriormente excretado pela urina. A forma activa da vitamina B6 – piridoxal fosfato – é um cofactor do enzima cistationina β -sintase (C β S), envolvida na conversão de homocisteína em cistationina, primeiro passo da via de transulfuração (figura 2)²⁴.

Num cenário de elevado stresse oxidante, a disponibilidade da FAD pode ser excedida devido à exigência por parte da activação da glutathione reductase (GR) porque a ingestão alimentar de riboflavina pode não ser suficiente para contrabalançar o gasto da FAD, levando eventualmente a uma diminuição da actividade da GR devido à falta do seu co-factor. O FAD tem um papel importante neste ciclo²⁵.

Uma resposta antioxidante insuficiente através de uma deficiência de riboflavina e uma actividade de GR diminuída pode ser um factor de risco para a hipertensão relacionada à obesidade assim como a elevados níveis plasmáticos de colesterol LDL. Foi sugerido que à medida que o IMC aumenta, uma ingestão elevada de riboflavina torna-se muito importante para a manutenção da actividade da GR e das defesas antioxidantes, minimizando assim o risco de doenças cardiovasculares²⁶.

A homocisteína plasmática pode encontrar-se na forma livre (cerca de 20-30%), mas a maior parte (70-80%) encontra-se associada a proteínas plasmáticas, principalmente a albumina. A homocisteína plasmática livre pode



ainda apresentar-se na forma oxidada, formando dois tipos de persulfuretos: dímeros de homocisteína ou dímeros de homocisteína-cisteína. Da fracção de homocisteína livre, 2 a 5% correspondem à sua forma reduzida. A homocisteína plasmática total é a soma de todas as formas livres e ligadas a proteínas²⁴.

Figura 2- Vias de metabolização da homocisteína. BHMT= betaina-homocisteína metiltransferase; MTHF= metilenotetrahidrofolato; MTHFR= metilenotetrahidrofolato redutase; NADPH= nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida; NADP+= nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (adaptado de Venâncio L.S et al, 2010).²⁷

A hiperhomocisteínemia é um factor de risco estabelecido para doenças caracterizadas por disfunção endotelial, tais como aterosclerose e a doença coronária, porém os mecanismos subjacentes ainda não estão completamente elucidados²⁸.

Vários estudos realizados demonstram que níveis plasmáticos elevados de homocisteína estão associados ao risco de doenças cardiovasculares tais como aterosclerose e trombose, defeitos do tubo neural, osteoporose, diabetes, doença renal, doença de Alzheimer e outras demências^{29,30,31}.

A homocisteína é produzida através da dieta alimentar (metabolismo da metionina) e convertida em cisteína através da via da transsulfuração e, 50% da cisteína em glutatióno, o mais poderoso antioxidante intracelular conhecido é derivado da homocisteína nas células de fígado humano, o local mais importante para este metabolismo, com uma contribuição relevante do rim, o que sugere a hipótese que os defeitos na via da transsulfuração perturbar a homeostase redox^{29, 32}.

O metabolismo da homocisteína é complexo³², sendo catalizado por várias enzimas que requerem as vitaminas do complexo B como co-factores e os níveis da homocisteína são responsáveis pelo estado do folato. A redução dos níveis de homocisteína pela suplementação destas vitaminas parece estar

relacionada com a redução do risco de episódios aterotrombóticos. A cisteína pode também ser catabolizada ou incorporada na síntese proteica ou do glutatono. No seu ciclo de metabolização a homocisteína é removida através da vitamina B6 sendo conduzida à produção de cisteína³⁰. Existe uma forte evidência da ligação da hiperhomocisteinémia e o folato com o stresse oxidante^{30,31}.

Os níveis de homocisteína em mulheres com pré-eclâmpsia encontram-se mais elevados comparativamente às gestantes normotensas. No entanto, estes níveis eram comparáveis àqueles verificados em mulheres não grávidas³³. Alterações nas concentrações de homocisteína são provavelmente o resultado do processo fisiológico da hemodiluição durante a gravidez normal, levando a níveis mais baixos no plasma, e o processo fisiopatológico da redução no plasma observado na pré-eclâmpsia, que pode ser tanto quanto 40% em casos graves, resultando em maiores níveis no plasma³⁴.

Foi demonstrado que os níveis plasmáticos maternos e fetais de homocisteína são elevados em mulheres com pré-eclâmpsia grave em comparação com pré-eclâmpsia ligeira e em grupos de controlo, não estando estes níveis elevados não relacionados com os níveis plasmáticos maternos ou fetais de ácido fólico e vitamina B12³⁵. Níveis elevados de homocisteína circulante foram referidos como sendo um factor de risco para disfunção endotelial e doença vascular, como aterosclerose e distúrbios vasculares oclusivos³⁶. A concentração plasmática de homocisteína tende a diminuir durante a gravidez normal, podendo este facto estar relacionado a factores como alterações hormonais associadas à gravidez e maior captação de homocisteína pelo feto, o aumento do volume plasmático e hemodiluição associada bem como à taxa de filtração

glomerular aumentada. Existindo por outro lado, vários estudos onde são sugeridos níveis elevados de homocisteína em gestantes com pré-eclâmpsia e que os níveis plasmáticos de homocisteína materna e fetal são significativamente mais elevados em mulheres com pré-eclâmpsia grave em comparação com aqueles com pré-eclâmpsia leve ou gestantes normotensas. Sendo que a activação ou disfunção das células endoteliais é um dos factores hipotéticos mais popular na etiopatogenia da pré-eclâmpsia. Pensa-se pois que a hiperhomocisteínemia durante a gravidez pode contribuir para ocorrência de pré-eclâmpsia³⁵.

O ácido fólico e as vitaminas B6 e B12 são fundamentais para uma correcta via metabólica da homocisteína³⁵. Há duas vias para o metabolismo da homocisteína: a remetilação em metionina ou através da via catabólica da transsulfuração em cistationina e cisteína. Para remetilação, é obrigatório a metionina sintase ter a vitamina B12 como coenzima e o ácido fólico como substrato²⁵. Defeitos tanto na transsulfuração ou na remetilação em metionina levam à acumulação de homocisteína³⁴. Existem formas de hiperhomocisteínemia causadas por mutação C677T (rs1801133) do enzima reductase do metiletilenotetrahydrofolato (MTHFR) que podem ser corrigidas com a administração de ácido fólico³⁵.

O **redutase do metiletilenotetrahydrofolato (MTHFR)** é o enzima responsável pela utilização do folato na sua forma biológica, quer para a síntese de DNA quer para a remetilação da homocisteína³⁷. O polimorfismo comum MTHFR C677T (rs1801133) (alteração de uma citosina por uma timina na posição 677) afecta a actividade do enzima, logo a distribuição do folato³⁷. O MTHFR é um enzima dependente do FAD (dinucleotídeo de flavina e adenina), e portanto

regulado pela biodisponibilidade da riboflavina (Vit B2), que catalisa a conversão irreversível de 5,10-metilenotetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato, o qual serve como dador de grupos metilo na reacção de remetilação da homocisteína (Hcy) em metionina. Este enzima reside num ponto de ramificação metabólica que dirige o folato para a remetilação da Hcy em detrimento da biossíntese de DNA e RNA e muitos outros metabolitos entre eles os fosfolípidos, creatina, etc³⁷.

O MTHFR adquiriu particular importância depois da descoberta de Kang *et al.*³⁸, que relataram que uma variante termolábil do enzima, a variante TT com menor actividade, estava associada com risco aumentado de doença cardiovascular e com aumento da concentração de homocisteína plasmática total (tHcy). Este efeito na concentração da tHcy era mais evidente nos indivíduos homozigóticos TT com concentrações baixas de folato³⁷. Por outro lado, o genótipo TT do MTHFR estava associado a uma menor taxa de metilação de DNA em comparação com o genótipo CC³⁷. Mais de 70% dos 67 indivíduos estudados por estes autores possuíam um genótipo TT combinado com deficiência em folato. Eram também mais fumadores, consumiam mais café e tinham um estilo de vida mais sedentário que os do genótipo CC ou CT³⁷.

A tHcy plasmática foi identificada como factor de risco para a aterosclerose, trombose das artérias coronárias, cerebrais, periféricas e venosas e também para a ocorrência de defeitos do tubo neural e outros defeitos congénitos, como cardiomiopatias, e outras complicações gestacionais³⁷. O MTHFR está envolvido no metabolismo da homocisteína e do folato, pelo que o seu polimorfismo MTHFR 677C→T (rs1801133) tem sido associado a complicações

na gravidez e a defeitos congénitos. O genótipo 677TT materno tem sido associado a um maior risco de descolamento prematuro da placenta em comparação com a variante CC³¹. O risco associado à restrição com atraso de crescimento intra-uterino (ACIU) parece aumentar com o número de alelos T.

Recentemente, verificou-se que a interacção epistática entre o MTHFR e a COMT, enzima que metaboliza o 2-hidroxiestradiol a 2-metoxiestradiol na placenta que afecta a resposta celular à hipóxia, parece contribuir de forma significativa para a susceptibilidade para a pré-eclâmpsia⁴⁰. Assim, a interacção entre alelos de risco materno e fetais destes enzimas envolvidos na metilação genética parece aumentar o risco para esta patologia, mesmo quando individualmente estes enzimas podem não ser considerados factores de risco⁴⁰.

O **redutase do dihidrofolato (DHFR)** é um importante enzima do ciclo do folato, responsável pela redução do dihidrofolato a tetrahydrofolato, dependente do NADPH. Este enzima encontra-se distribuído por todos os organismos, desempenhando um papel crucial na regulação da concentração de tetrahydrofolato celular⁴¹. O tetrahydrofolato e compostos derivados do folato são essenciais para a síntese das purinas, elementos fundamentais para a síntese do DNA celular, e para a remetilação da homocisteína⁴¹. Em 2004 foi descrito um polimorfismo de deleção de 19-bp no intrão 1 do DHFR. Recentemente, verificou-se que o genótipo del/del 19-bp estava associado a uma concentração mais baixa de homocisteína no plasma⁴¹. Alguns autores têm-se focado no polimorfismo DHFR deleção 19-bp como indicativo de um factor de risco para espinha bífida ou partos prematuros⁴¹. O DHFR catalisa a redução do ácido fólico para dihidrofolato e posteriormente, em tetrahydrofolato⁴². A acção do polimorfismo do DHFR c.86 + 60_78

inserção/deleção (ins/del) (rs70991108) nas concentrações plasmáticas de folato e homocisteína foi analisada em adultos jovens saudáveis de ambos os sexos da Irlanda do Norte⁴². Em relação às mulheres com genótipos DHFR c.86 + 60_78 ins/ins e ins/del (rs70991108), as homozigóticas del/del tinham concentração de folato plasmático e eritrocitário aumentado, podendo estar associado a um menor risco de ter filhos afectados por doenças do tubo neural e outros defeitos congénitos atribuíveis aos baixos níveis de folato⁴².

A hiperhomocisteinémia, resultante de uma deficiente conversão de homocisteína em cistationina, constitui-se como factor de risco isolado para doenças vasculares. A mutação 844ins68 do gene da **Beta Sintase da Cistationina (CβS)** (rs72058776) parece estar associada a um aumento da actividade do enzima, o que poderá diminuir o risco de doença cardiovascular e hipertensão, ao aumentar a metabolização da Hcys⁴³.

Foi também referido que uma associação positiva da cisteína plasmática total (tCys) com índice de massa corporal (IMC) sugerem que a homocisteína e tCys podem estar associadas com a composição corporal, que também é considerado um factor de risco para a pré eclâmpsia⁴⁴.

A **catecol-O-metiltransferase (COMT)** é um dos vários enzimas que degradam as catecolaminas, como a dopamina, a epinefrina e a norepinefrina³². A actividade da COMT encontra-se significativamente diminuída nas mulheres com diagnóstico de pré-eclâmpsia⁴⁰. Além disso, a pré-eclâmpsia grave e o atraso de crescimento intrauterino (ACIU) têm sido associadas com actividades diminuídas da COMT placentária⁴⁰. O gene da COMT apresenta um polimorfismo funcional, Val158Met (rs165599), que se encontra associado a alterações na actividade enzimática⁴⁵. O genótipo Val/Val

(alta actividade) parece estar associado a um aumento da pressão arterial sistólica em comparação com genótipos Met/Met ou Met/Val” (baixa/intermédia actividade)⁴⁵.

Os estrogénios regulam vários processos biológicos envolvidos na fisiopatologia do enfarte do miocárdio”, sendo a COMT o enzima chave na degradação destes metabolitos. Verificou-se que o genótipo com baixa actividade da COMT se encontra associado a um risco menor de enfarte do miocárdio⁴⁶.

1.4 Relação entre o metabolismo da Homocisteína e a ingestão de ácido fólico, vitaminas do complexo B e colina

Os folatos (vit. B9) são substâncias portadoras de uma unidade de carbono e são metabolizados pelo 5, 10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) e outros enzimas que usam a riboflavina (vit. B2), cobalamina (vit. B12) ou vitamina B6 como cofactores. Estas vitaminas do complexo B são essenciais para o metabolismo da homocisteína⁴⁷.

A importância do **ácido fólico (Vitamina B9)** durante a gravidez foi evidenciada há 40 anos num estudo sobre os níveis de folatos em 1484 mulheres da zona de Liverpool, que não tiveram acesso a acompanhamento pré-natal⁴⁸. Foram avaliados os níveis de folatos, assim como, a excreção urinária de ácido formiminoglutâmico (FIGLU). A excreção anormal deste ácido foi relacionada não só com o descolamento prematuro da placenta e aborto espontâneo, mas também com condições adversas em gestações anteriores, incluindo a prematuridade, defeitos congénitos e mortalidade perinatal⁴⁸. Pouco

tempo depois, outros autores sugeriram que a deficiência em folato durante a gestação pode estar relacionada com malformações do sistema nervoso central, e foram iniciados uma série de estudos observacionais e de intervenção que demonstram que os níveis de folatos adequados reduzem o risco de defeitos do tubo neural (DTN), observações que eventualmente no início de 1990 foram confirmados em grandes estudos aleatorizados⁴⁸. Encontra-se agora estabelecido que a suplementação periconcepcional de folato reduz a ocorrência e recorrência de DTN. Foram obtidos resultados em diversos estudos observacionais sugerindo que a ingestão insuficiente de folato ou a sua baixa concentração em circulação aumenta o risco de baixo peso ao nascer e de parto prematuro⁴⁸.

A disponibilidade dos folatos é um co-factor muito importante no metabolismo onde são os principais doadores de um grupo metilo. É encontrado nos alimentos sob a forma de 5-metil-tetrahidrofolato predominantemente e sob a forma de ácido fólico (a sua forma sintética) após suplementação⁴⁹. As suas principais fontes alimentares são vegetais de folhas verdes, feijão cozido, e cereais enriquecidos⁵⁰.

Também o ácido fólico (e as vitaminas B2, B6, B12) são essenciais para uma via metabólica adequada de remetilação da homocisteína³⁵.

Estudos realizados com suplementação em ácido fólico e vitamina B6 a pacientes com história prévia de pré-eclâmpsia, síndrome HELLP grave e hiperhomocisteínemia demonstraram que apesar de metade das pacientes terem desenvolvido pré-eclâmpsia, o resultado foi mais evidente do que sem a suplementação. Porém noutro estudo realizado, os níveis de vitamina B12 e ácido fólico não foram significativamente diferentes na pré-eclâmpsia e nos

grupos controlo³⁵. A metilação do DNA pode ser afectada por alterações no aporte de folato. Níveis baixos de folato na gravidez estão associados a parto prematuro e a um deficiente crescimento placentar⁵¹. Por outro lado, níveis elevados de homocisteína estão associados a pré-eclâmpsia⁵². A eficácia da suplementação em ácido fólico, na sua forma sintética, na prevenção de defeitos do tubo neural foi alvo de imensos estudos e está hoje comprovada⁴⁹. Porém ainda não existem estudos que comprovem efectivamente uma relação directa entre a ingestão de folato e a redução das complicações na gravidez⁴⁹. Por outro lado, uma alimentação rica em gordura durante a gravidez pode aumentar o risco de cancro da glândula mamária na descendência⁴⁹. Por sua vez, se for rica em ácidos gordos ómega 3 parece reverter a hiperleptinémia e a hipertensão arterial⁵³. Do mesmo modo uma alimentação rica em sacarose aumenta o risco de diabetes tipo 2 no futuro⁵⁴.

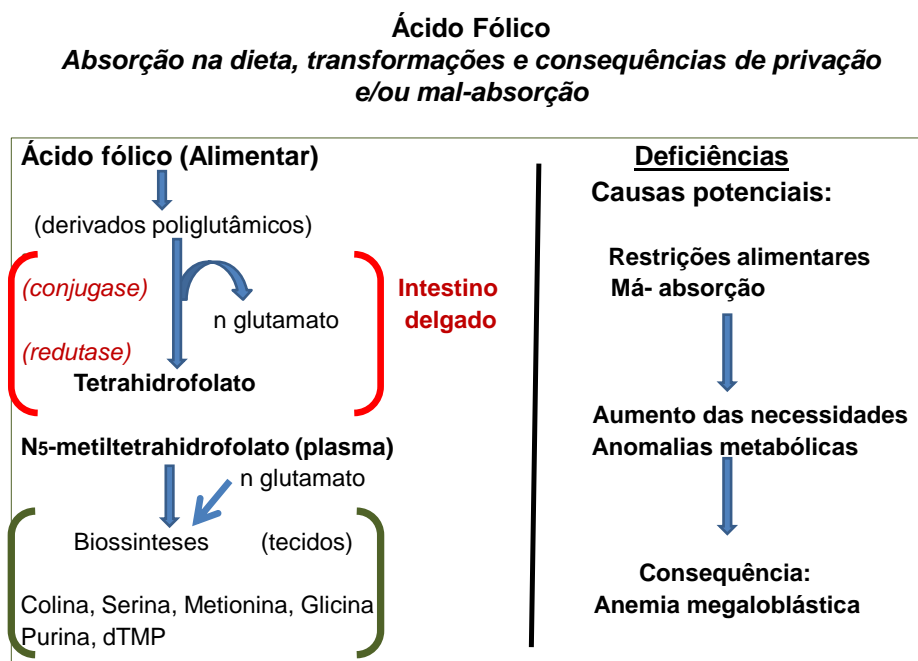


Figura 3- Absorção, transformações e consequências da mal-absorção do Ácido fólico (adaptado de J. Martins e Silva *et al*)⁵⁵

A **Cobalamina (Vitamina B12)** tem inúmeras funções tais como o transporte plasmático (cobalamina- transcobalamina II), forma nos tecidos-alvo (hidroxicobalamina, metilcobalamina e 5'- desoxiadenosil cobalamina), a acção da metilcobalamina no citosol, na conversão de homocisteína em metionina, na presença de N5- metil5 H4 folato, e da 5- desoxiadenosilcobalamina (mitocondrial) na síntese da metilmalonil CoA (transformação em succinil CoA)⁵⁵. Para melhorar os níveis de vitamina B12 plasmática a ingestão de produtos lácteos e peixe é um contributo significativo. Os baixos níveis de vitamina B12 podem estar associados com anemia megaloblástica e distúrbios neurológicos, como neuropatia, mielopatia, demência, depressão, atrofia cerebral e doença cerebrovascular⁵⁶. Estudos recentes indicam que concentrações plasmáticas de vitamina B12 subóptimas ou marginais podem ocorrer em crianças e são altamente prevalentes entre os idosos⁵⁷. A prevenção de baixos níveis de vitamina B12 é de suma importância, pois alguns dos sinais neurológicos e sintomas psiquiátricos podem ocorrer em pacientes com concentrações de vitamina B12 no intervalo antes considerado abaixo do normal e sem anemia associada ou macrocitose⁵⁶. Além disso, evidências crescentes sugerem que níveis baixos de vitamina B12 podem ser uma preocupação especial em indivíduos com uma alta ingestão de ácido fólico, como é frequentemente o caso nesta época da suplementação com ácido fólico⁵⁸. As causas típicas da deficiência de cobalamina em idosos incluem anemia perniciosa e má absorção alimentar, mas essas causas explicam menos de metade dos baixos níveis de vitamina B12⁵⁹. As principais fontes desta vitamina são o fígado (carnes vermelhas), ovos, leite e peixe⁶⁰.

Elevados níveis plasmáticos desta vitamina, em estudos de coorte e de folato têm sido associadas com o aumento do risco de cancro na próstata⁶¹. No entanto não tiveram efeito significativo no risco generalizado de cancro total invasivo ou da mama em mulheres com suplementação desta vitamina⁶². Mas o tratamento com ácido fólico, além da vitamina B12 foi associado a uma prevalência de cancro e mortalidade por todas as causas aumentadas em pacientes com doença isquémica do coração, na Noruega, onde não há adição de ácido fólico dos alimentos⁶³.

Foi demonstrado recentemente, em indivíduos saudáveis, que a concentração de **Riboflavina (Vitamina B2)** está inversamente relacionada com a concentração de tHcy, sendo esta relação válida para baixas e altas concentrações de folato plasmático³⁷. Uma possível regulação entre a distribuição do folato e a concentração de tHcy pode estar relacionada com a biodisponibilidade da riboflavina e o polimorfismo MTHFR C677T, uma vez que o FAD funciona como co-factor para a actividade do MTHFR e do DHFR, e importante coenzima da redutase do glutatono (GR)³⁷. As principais fontes de riboflavina são: os cereais, legumes secos e verdes, leite, carne, peixe, ovos e vísceras⁶⁰.

A **Piridoxina, piridoxal, piridoxamina (vitamina B6)** existe em diferentes formas, uma das quais o 5'-fosfato de piridoxal (PLP) que serve de cofactor em várias reacções enzimáticas, como a via de transulfuração da HCys, na qual a homocisteína é convertida em cistationina e posteriormente, em cisteína⁶⁴. Os dados sobre as relações entre os níveis de vitamina B6 e os metabolitos da transulfuração no plasma são escassos e controversos⁶⁴.

As suas principais fontes vegetais são os cereais, legumes secos e a batata. Dos alimentos animais são o fígado, a carne e o queijo. Os ovos têm pouca quantidade e o peixe tem uma quantidade média⁶⁰.

A **colina** um nutriente essencial encontrado em produtos de origem animal, como ovos, fígado e carne, mas também em alguns produtos de origem vegetal, incluindo o gérmen de trigo e soja⁶⁵. Apesar de possuímos uma via para a síntese endógena da colina, uma dieta deficiente em colina prejudica o crescimento, a memória, a função hepática, renal e do pâncreas⁶⁵. A fosfatidilcolina (lecitina) é uma importante fonte alimentar de colina principalmente em mulheres se que encontrem em pré-menopausa⁶⁵. A colina tem um papel importante no sistema nervoso central, metabolismo lípidico, bem como para a síntese de fosfatidilcolina da membrana e da acetilcolina⁶⁵. Uma dieta saudável, pobre em gorduras e rica em vegetais, fruta, carne branca, produtos lácteos magros é benéfica. Doces, bolos e produtos lácteos ricos em gordura são pobres em colina⁶⁵.

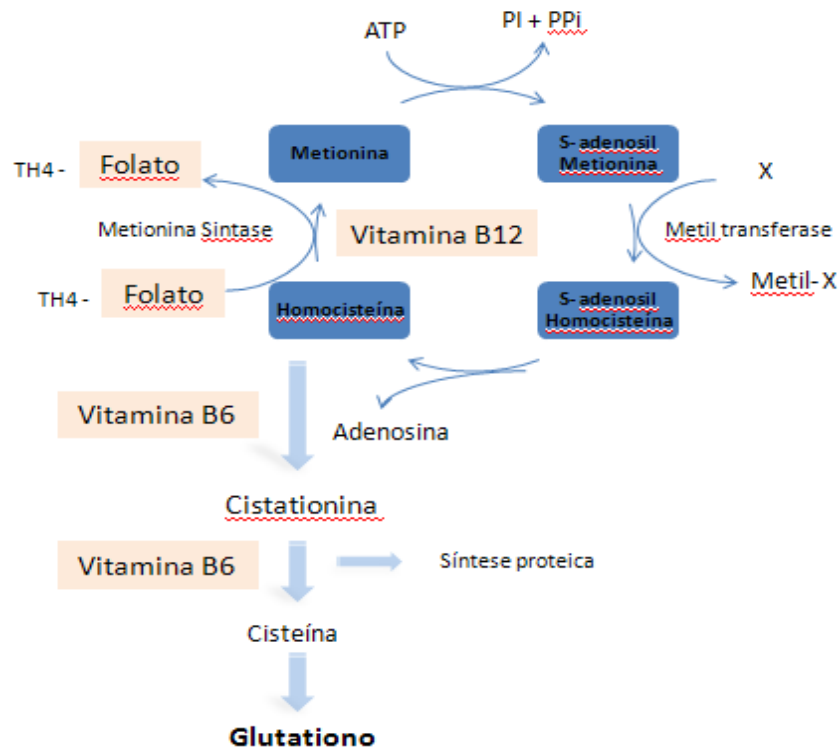


Figura 4- Metabolismo da Homocisteína. (Adaptado de: Universidade Federal da Bahia, Bioqmed I: Metabolismo da Homocisteína ICS 058- Bioquímica Médica I- 2009.1)

1.5 Redefinição actual da Doença Hipertensiva da Grávida

Recentemente foram feitos estudos que propõem redefinir e modernizar o termo clássico de pré-eclâmpsia, que é baseada em conceitos com mais de 50 anos já desactualizados, através de uma melhor compreensão actual da fisiopatologia da doença e usando biomarcadores derivados da placenta como o factor de crescimento placentário (PIGF) que podem ser identificados separadamente e incorporados nesta definição, apesar da definição também poder ser estendida aos factores antiangiogénicos⁶⁶.

As definições de pré-eclâmpsia e outros distúrbios hipertensivos da gravidez são baseados nos limiares da pressão sanguínea e proteinúria antes e durante a segunda metade da gravidez⁶⁷ sendo assim um síndrome de hipertensão (> 140/90 mmHg) e proteinúria (> 0.3 g per 24 horas) depois das 20 semanas de gestação⁶⁸. Foi agora alargada esta definição incluindo novos valores de hipertensão, proteinúria e características fetais (> ou igual 1), tais como disfunção hepatocelular, insuficiência renal ou restrição do crescimento fetal (FGR). Esta foi a primeira vez que o envolvimento fetal foi incluído como um possível componente do síndrome. As definições de pré-eclâmpsia podem ser usadas tanto para a prática clínica ou de pesquisa, onde os critérios objectivos são obrigatórios para assegurar a aplicação uniforme por diferentes investigadores⁶⁹.

Pretende-se que uma melhor classificação de pré-eclâmpsia, com base em biomarcadores patologicamente relevantes, tais como PIGF, aumente a confiabilidade e a reprodutibilidade dos estudos de avaliação para a previsão, o diagnóstico ou prevenção de pré-eclâmpsia. Por exemplo, uma vez que a pré-eclâmpsia está associada com a doença cardiovascular a longo prazo, uma boa classificação dos seus componentes poderia melhorar a previsão de consequências cardiovasculares a curto e longo prazo para a mãe e para a criança, identificando grupos-alvo com maior risco para doença cardiovascular futura⁶⁹.

Se, de facto, as apresentações que se encaixam na definição clássica de pré-eclâmpsia, sem evidência de disfunção placentar forem compatíveis com o diagnóstico de pré-eclâmpsia materna, isto poderá esclarecer algumas questões e promover investigações e aplicações clínicas⁶⁹.

Uma gravidez normal é caracterizada por uma resposta inflamatória sistêmica de baixo grau comparativamente ao estado não gravídico. A pré-eclâmpsia materno-placentária é primeira forma grave e início precoce da síndrome⁷⁰.

A maior parte da pré-eclâmpsia ocorre em termo, isto é, após 37 semanas de gestação^{71,72}. Embora esta pré-eclâmpsia seja menos frequentemente associada com disfunção placentar, complicações maternas graves podem ocorrer. Por outras palavras, esta pré-eclâmpsia não é “benigna” só pelo facto de o feto ser menos ameaçado pelo ACIU como na forma inicial. Foi sugerido que a pré-eclâmpsia materna pode ser accionada por um resposta materna exagerada à gravidez e ao funcionamento normal da placenta, tal como ocorre nos estados bem definidos de inflamação sistêmica associada à hipertensão crónica, obesidade e diabetes mellitus tipo 2, ou síndrome metabólica quando estas condições coexistem^{73,74}.

Durante a segunda metade da gravidez, a combinação inflamação sistêmica normal da gravidez e inflamação vascular pré-existente pode ser excessiva e gerar as características clínicas da síndrome pré-eclâmpsia (Fase 3). A pré-eclâmpsia precoce e tardia têm diferentes particularidades e são agora geralmente aceites como subtipos de pré-eclâmpsia⁷⁵.

Um limiar de 34 semanas é geralmente usado para distinguir as duas⁶⁹.

Uma placentação deficiente foi incorporada num modelo de três estadios de pré-eclâmpsia⁷⁶. A fase 1 corresponde a uma intolerância por parte do feto alogénico que se presume ocorrer muito cedo na gravidez, a fase 2 a uma placentação incompleta com remodelação reduzida das artérias maternas

útero-placentárias e a fase 3 a seguem-se o stresse oxidante e suas consequências placentares difundidas para a circulação sistémica materna, causando inflamação sistémica excessiva, disfunção endotelial e consequentemente sinais de pré-eclâmpsia⁷⁷. Foi proposto que estes componentes possam ser utilizados para definir os subtipos de pré-eclâmpsia parecendo existir duas formas para fase 3⁷⁶, sendo a primeira impulsionada principalmente pela placentação deficiente (Fase 1 e 2) e a segunda por anomalias maternas subjacentes.

Uma redefinição de pré-eclâmpsia, dirigida para uma melhoria da gestão clínica da mãe e do feto durante a gravidez e para acompanhamento adequado após a gravidez pode contribuir para uma melhor saúde da mãe e filho a curto e longo prazo. É provável que o impacto pré-existente da inflamação sistémica não se limite ao fim da gravidez. Por exemplo, não é conhecido se a inflamação sistémica pré-gestacional (como acontece com a obesidade) poderá afectar a placentação e a remodelagem das artérias espiraladas uteroplacentares, contribuindo para tipos mistos de pré-eclâmpsia, porque a inflamação sistémica se reflectiu no momento da concepção e placentação subsequente, aumentando a produção local de citocinas inflamatórias.⁷⁸ Numa gravidez normal o PIGF livre pode ser detectado na circulação sanguínea da mãe desde a 8ª semana de gestação e a sua concentração vai aumentando gradualmente desde o início da gravidez até às 29 a 33 semanas de gestação começando de seguida a diminuir substancialmente até ao parto^{79,80,81,82}.

Numa gravidez pré-eclâmpsica as concentrações do PIGF estão significativamente mais baixas em relação às de uma gravidez normal para a

mesma idade gestacional. Para além disso, mulheres que desenvolvam pré-eclâmpsia antes das 35 semanas de gestação parecem ter concentrações de PIGF muito baixas na circulação antes do início da doença e no momento do diagnóstico⁸². A pré-eclâmpsia além das 35 semanas de gestação não parece estar associada com descidas tão acentuadas no PIGF circulante nem nos níveis do tecido placentar⁸². Além disso, casos com ACIU associada com patologia placentar, indicativa de má perfusão placentar, teve igualmente PIGF baixo antes das 35 semanas, validando que esta medida é uma das funções da placenta, e não a da resposta materna à função anormal placentar⁸³.

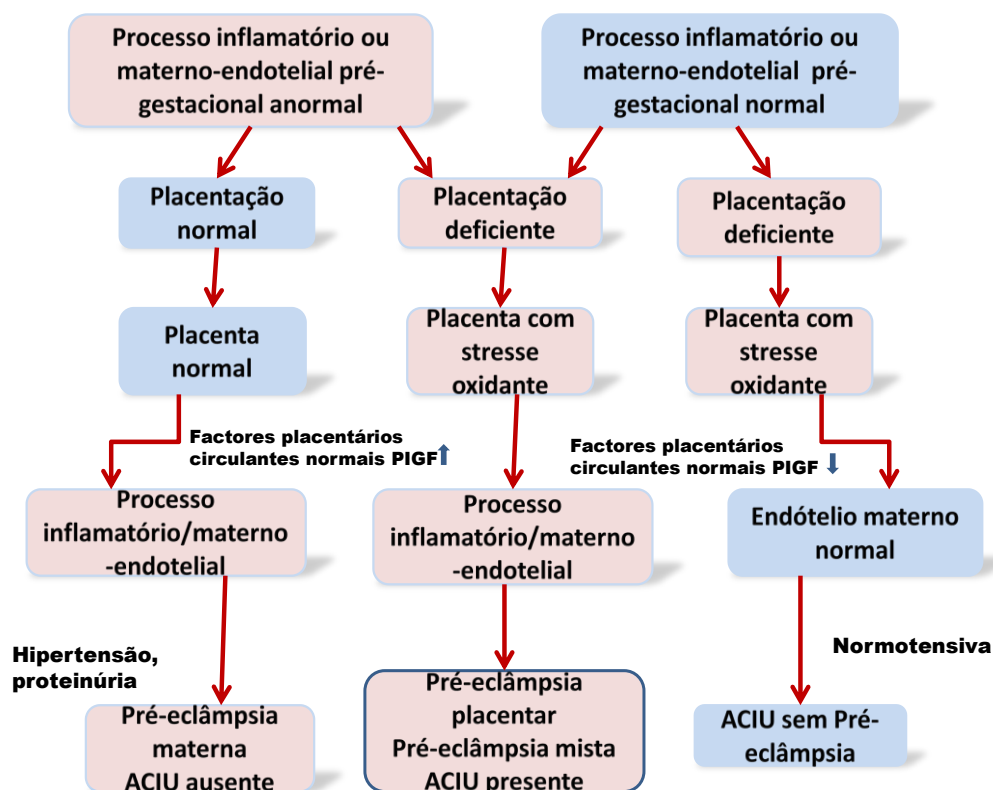


Figura 5- Modelo da definição extensiva da Pré-eclâmpsia baseado em biomarcadores derivados da placenta (PIGF, S-FLT), (adaptado de Staff Anne Catherine, *et al*)⁶⁹

2. OBJECTIVOS

Este estudo teve como primeiro objectivo estudar a predisposição genética para a doença hipertensiva da gravidez.

O segundo objectivo foi estudar a predisposição genética para a evolução da doença hipertensiva da gravidez para doença cardiovascular futura. Esta predisposição genética teve como base a participação de alguns polimorfismos genéticos de enzimas das vias de metabolização da Homocisteína (biomarcador circulante de doença cardiovascular) do ácido fólico e da utilização da SAM (COMT) como biomarcadores de risco de doença hipertensiva da grávida nas suas várias formas clínicas, relacionando-os com biomarcadores circulantes numa perspectiva global (genótipo, fenótipo intermédio e fenótipo clínico).

3. METODOLOGIA

3.1 População em estudo

Para o primeiro estudo utilizou-se uma amostra populacional de 380 mulheres (181 grávidas normotensas e 199 grávidas com hipertensão da gravidez) com proveniência da Clínica de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina de Lisboa e do Hospital de Santa Maria (Director Professor Dr. Luís Mendes Graça) entre 1998 e 2004 e da consulta da hipertensão da grávida da Maternidade Júlio Dinis no Porto (Dra. Maria José Areias) este último estudo teve a colaboração da Professora Dra. Irene Rebelo da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

No segundo estudo, a amostra foi constituída por 170 mulheres estudadas 2-16 anos após o parto (90 mulheres com doença hipertensiva da gravidez e 80 mulheres ajustadas por idades com história pregressa negativa para a hipertensão arterial), com proveniência da consulta de Hipertensão da grávida da Maternidade Júlio Dinis no Porto (Dra. Maria José Areias) em colaboração com a Professora Dra. Irene Rebelo da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Como grupo controlo deste estudo utilizou-se também uma amostra de 174 mulheres sem história conhecida de gravidezes com origem no programa PESO (Promoção de Exercício e Saúde na Obesidade) da Faculdade de Motricidade Humana da Universidade Técnica de Lisboa (Professor Dr. Luiz Sardinha e Maria José Laires). Os critérios usados para as definições da hipertensão da grávida e da hipertensão em geral foram respectivamente os da ACOG/ISSHP (American College of Obstetricians and

Gynecologists/International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy) e da Sociedade Europeia de Hipertensão (ESH).

Tratou-se de um estudo analítico, observacional, retrospectivo e transversal, tendo como variáveis conceptuais principais: a idade, idade gestacional, parâmetros antropométricos e hemodinâmicos, os polimorfismos genéticos funcionais da MTHFR, DHFR, C β S e COMT assim como variáveis baseadas em biomarcadores circulantes.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Extracção de DNA

A extracção de DNA foi realizada, a partir dos leucócitos do sangue total dos doentes e indivíduos saudáveis utilizando o kit comercial de extracção de DNA em sangue total e/ou buffy coat. Este kit baseia-se em três passos principais: lise das membranas nucleares, precipitação e remoção das proteínas e precipitação do DNA.

3.2.2 PCR

A técnica de PCR (*polimerase chain reaction*) consiste na desnaturação das cadeias de DNA, seguida de emparelhamento (*annealing*) e extensão das cadeias (Quadro 1) tendo como objectivo obter múltiplas cópias de uma sequência específica de DNA. Trata-se de um processo simples que ocorre por ciclos dividido nas três fases acima referidas: desnaturação, emparelhamento e extensão, utilizando o termociclador da Applied Biosystems.

A desnaturação, a 94°C, provoca a separação da cadeia dupla da molécula do DNA por quebra das pontes de hidrogénio que ligam as bases complementares. Quando a temperatura baixa para os 60-65°C dá-se o emparelhamento dos *primers* (*Alfagene*). Formam-se novamente pontes de hidrogénio entre a cadeia simples de DNA e o *primer* complementar. De seguida a Taq polimerase vai ligar-se ao *primer* a fim de começar a síntese de DNA. A enzima dará início à extensão da cadeia complementar do DNA que se pretende amplificar utilizando os dNTP's livres quando a temperatura aumenta para os 75-80°C, dando origem a uma nova cadeia dupla (Figura 3).

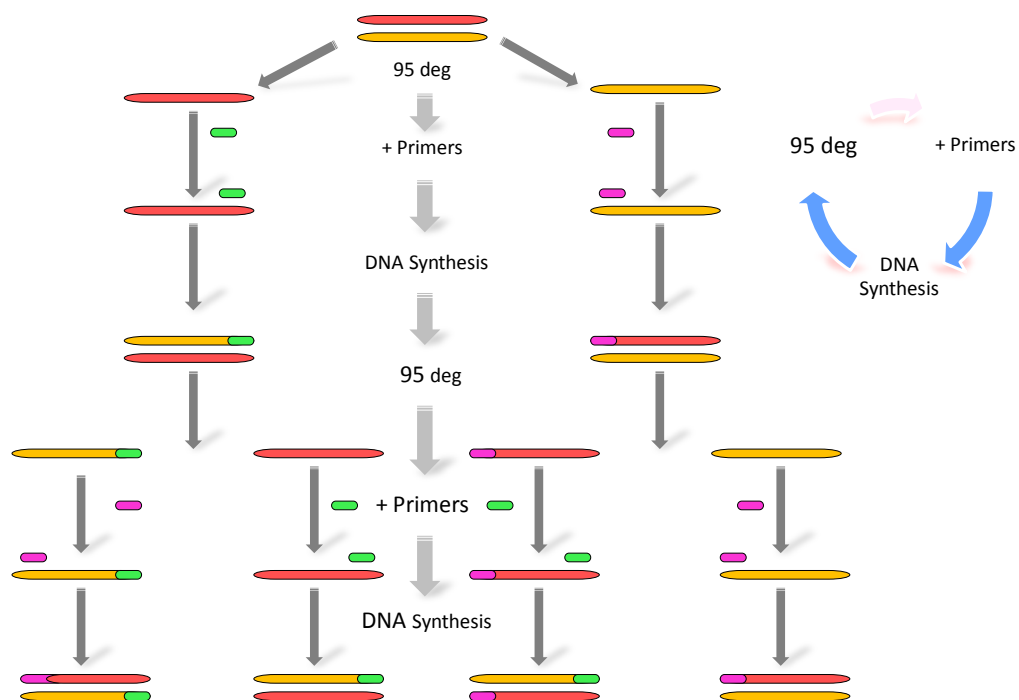


Figura 6 - Esquema representativo da técnica de PCR (adaptado de Lecture 24: Genetic Engineering: PCR, RFLP Analysis & Gene Therapy <http://acccn.net/Bio/book/BearFlag45/Biology1A/LectureNotes/lec24.html>)

As reacções de PCR foram realizadas com 200 ng de DNA, 10 pmol de *primers* específicos para cada polimorfismo e uma MixMaster (DyNAzyme* II PCR Master Mix-ThermoScientific) contendo 0.04 U/μl DyNAzyme II DNA Polymerase, 2x Tampão DyNAzyme optimizado e 400 μM de cada dNTP.

Quadro 1- Detalhes da técnica PCR para detecção dos polimorfismos genéticos MTHFR, DHFR, CβS e COMT

Polimorfismos	Primers	Reagentes (Volume final)	PCR
MTHFR C677T (enzima de restrição HinfI)	Foward: 5'– TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA – 3' Reverse: 5'- AGGACGGTGCGGTGAGAGTG – 3'	Hotstart (2 min a 94°)-10 µl DNA Primer Foward (1:10)- 1 µl Primer Reverse (1:10)- 1µl MasterMix- 25 µl Água destilada-13 µl	30 ciclos Desnaturação: 30 seg a 94° Annealing: 30 seg a 61° Extensão: 1 min a 72° Extensão final: 7 min a 72°
DHFR del19 pb intrão 1	Foward: 5'– TCAGGTATCTGCCGGGCC – 3' Reverse: 5'- AAAAGGGGAATCCAGTCGG – 3'	Hotstart (2 min a 94°)-10 µl DNA Primer Foward (1:10)- 1 µl Primer Reverse (1:10)- 1µl MasterMix- 25 µl Água destilada-13 µl	35 ciclos Desnaturação: 30 seg a 94° Annealing: 30 seg a 60° Extensão: 45 seg a 72° Extensão final: 7 min a 72°
CβS ins68 pb exão 8	Forward: 5' - GCAGTTGTTAACGGCGGTATTG - 3' Reverse: 5' – GCCGGGCTCTGGACTCGACCTA – 3'	Hotstart (2 min a 94°)-10 µl DNA Primer Foward (1:10)- 1 µl Primer Reverse (1:10)- 1 µl MasterMix- 12,5 µl Água destilada- 0,5 µl	40 ciclos Desnaturação: 30 seg a 94° Annealing: 30 seg a 62° Extensão: 40 seg a 72° Extensão final: 10 min a 72°
COMT Val158Met (enzima de restrição Nla III (Hin 1II))	Forward: 5'- GGTCATCACCATCGAGATCAA - 3' Reverse: 5'- CCAGGTCTTGACAACGGGTCA – 3'	Hotstart (2 min a 94°)10 µl DNA Primer Foward (1:10)- 1 µl Primer Reverse (1:10)- 1µl MasterMix- 25 µl Água destilada-13 µl	35 ciclos Desnaturação: 45 seg a 94° Annealing: 45 seg a 60° Extensão: 1 min a 72° Extensão final: 7 min a 72°

No caso dos polimorfismos da MTHFR e da COMT, foram experimentados no Laboratório de Genética e os resultados cedidos para esta investigação. Estes produtos de PCR foram posteriormente submetidos à técnica de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism- polimerase chain reaction) (Fermentas), técnica que consiste em quebrar as cadeias de DNA em locais específicos utilizando enzimas de restrição que reconhecem sequências específicas que contêm as zonas do DNA a analisar. Os fragmentos obtidos são separados conforme o tamanho por electroforese em gel de agarose. Para o estudo da MTHFR utilizaram-se 5U do enzima de restrição HinfI e para o estudo da COMT utilizaram-se 3U do enzima de restrição Nla III (Hin 1II).

3.2.3 Gel de agarose

As bandas de DNA correspondentes a cada polimorfismo foram analisadas num gel de agarose (Cambrex) em solução tampão TAE 1x (Tris-Acetato 40mM, EDTA 1mM pH 8.0) contendo 10 µg/ml de brometo de etídio, substância mutagénica, tendo sido manuseado com medidas de segurança rigorosas. Posteriormente, as bandas foram visualizadas sob radiação ultravioleta através de um transiluminador (VWR GenoSmart). O tamanho das moléculas de DNA varia com a concentração de agarose em que a mais concentrada retarda a migração das moléculas que se pretende separar.

Quadro 2 – Características do gel de agarose e perfis após análise de restrição dos polimorfismos genéticos MTHFR, DHFR, C β S e COMT

Polimorfismos	Gel da Agarose (%) / Voltagem / Tempo	Bandas
MTHFR C677T	4% / 85 volts / 90 min	Homozigóticos sem mutação (CC) - 198 pb Heterozigóticos (CT) - 198 e 175 pb Homozigótico com mutação (TT) - 175 pb
DHFR del19 pb intrão 1	4% / 80 volts / 60 min	Homozigóticos sem deleção - 144 pb [High] (ins) Heterozigóticos - 144 e 125 pb (ins/del) Homozigóticos com deleção - 125 pb [Low] (del)
CBS ins68 pb exão 8	3% / 80 volts / 60 min	Homozigóticos sem inserção – 252 pb (-/-) Heterozigóticos – 320 e 252 pb (+/-) Homozigóticos com inserção – 320 pb (+/+)
COMT Val158Met	4% / 85 volts / 90 min	Homozigóticos sem mutação (GG) - 89 e 22 bp [High] Heterozigóticos (GA) - 89, 71, 22 e 18 bp Homozigótico com mutação (AA) – 71, 22 e 18 bp [Low]

A Figura 7 corresponde a uma fotografia de um gel de agarose com as características descritas no Quadro 2, onde se podem visualizar os fragmentos de DNA amplificados, identificando os diferentes genótipos do referido polimorfismo.

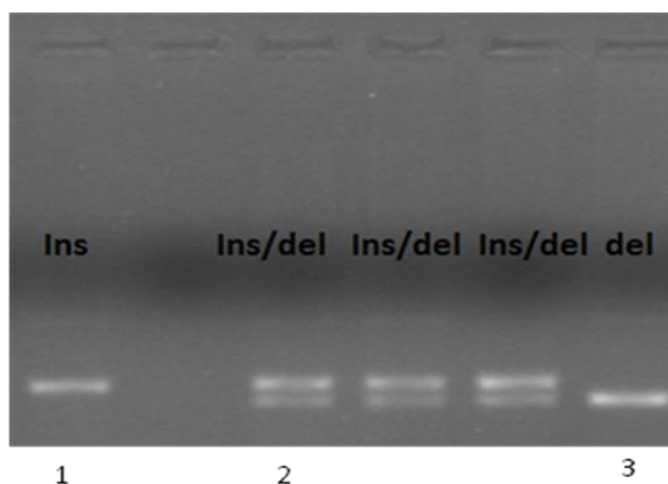


Figura 7 – Fotografia do gel de agarose onde se identifica no canal 1(Ins/ins) a homozigotia sem deleção, no canal 2 (Ins/del) a heterozigotia e no canal 3 a homozigotia com deleção (Del/del).

A Figura 8 corresponde a uma fotografia de um gel de agarose com as características descritas no Quadro 2, onde se podem visualizar os fragmentos de DNA amplificados, os diferentes genótipos do referido polimorfismo.



Figura 8 - Fotografia do gel de agarose onde se identifica no canal 1 (-/-) a homozigotia sem inserção e no canal 2 (+/-) a heterozigotia.

Nitritos e Mieloperoxidase (MPO)- Os nitritos, nitratos e mieloperoxidase foram determinados através de um kit comercial enzimático e a [MPO] (ng/ml) foi determinada utilizando o método ELISA (“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Essay”).

Os restantes parâmetros metabólicos e hematológicos foram determinados através de métodos padronizados.

3.3 Tratamento de dados e métodos estatísticos

O tratamento dos dados estatísticos foi realizado utilizando o programa SPSS® vs 20.0. Os resultados de cada parâmetro nos indivíduos controle e nos doentes serão apresentados sob a forma de percentagens ou média \pm desvio-padrão, medianas e intervalos mínimos e máximos. As diferenças de médias entre grupos (para mais de dois grupos) serão determinadas através do teste one-way ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Para a análise estatística também foi utilizado o T-Student. Sempre que necessário foram utilizados os testes de Levene e Fisher's exact test. As associações estatísticas entre os diferentes parâmetros (variáveis discretas como os genótipos e as frequências alélicas entre os casos e os controles) serão determinadas pelo teste do Qui-Quadrado. O nível de significância usado será de $p < 0.05$. O desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado usando o teste padrão do Qui-quadrado X^2 de Pearson. Os riscos relativos para a patologia associados com cada genótipo foram estimados através do cálculo dos *odds ratios* (OR) com intervalos de confiança (IC) a 95%, Qui-quadrado X^2 e significado estatístico (p) utilizando o programa Primer (Primer of biostatistics version 5.0 software for IBM PC)⁸⁴.

4. RESULTADOS

4.1 Dados demográficos

Neste primeiro estudo foram contempladas um total de 380 amostras de sangue de mulheres grávidas (normotensas e hipertensas).

Estas 380 mulheres tinham idades compreendidas entre 18 e 47 anos, 181 eram grávidas normotensas e 199 grávidas hipertensas. Das 380 mulheres grávidas (normotensas e hipertensas) foram obtidos dados clínicos da idade, idade gestacional e IMC. Das restantes 210 foram obtidos só a idade e idade gestacional.

No segundo estudo foram estudadas 170 mulheres com idades compreendidas entre 20 e 35 anos (idade pré-parto), subdivididas em 2 subgrupos: um de 90 mulheres que tiveram doença hipertensiva da gravidez e outro de 80 mulheres ajustadas pela idade com história pregressa negativa para a hipertensão arterial estudadas 2-16 anos após das respectivas gravidezes.

Como grupo controlo utilizou-se uma amostra de 174 mulheres não grávidas sendo obtidos a idade, IMC, glicémia e pressões arteriais.

.

4.2 Pré disposição genética para a Doença hipertensiva da gravidez na população portuguesa

4.2.1 Caracterização da amostra total

Foi estudada uma população de mulheres antes, durante e após período gravídico (Quadro 3).

Em que a média do peso pré gravidez é de $61,81 \pm 11,56$, a média do IMC é de $23,96 \pm 4,43$ e a média das idades é de $28,73 \pm 5,12$ com idades compreendidas entre 20 e 35 anos.

Foram consideradas 380 mulheres grávidas, sendo 181 (47,6%) normotensas e 199 (52,4%) hipertensas, com idades compreendidas entre 18 e 47 anos. Apresentam uma idade gestacional mínima de 18 semanas e máxima de 42 semanas cuja mediana é de 38 semanas (média de $35,74 \pm 4,58$). Destas mulheres 70,3% estavam acima das 34 semanas de gestação e 29,7% estavam abaixo das 34 semanas de gestação.

Após a gravidez a média de idades é de $32,54 \pm 6,48$ e um IMC mínimo de 17,1 (baixo peso) e 42,7 (obesidade) cuja média é $26,39 \pm 4,57$ após a gravidez. Tendo em conta a população das grávidas utilizou-se como grupo controlo o parâmetro HTA ou seja, as grávidas normotensas.

Quadro 3: Distribuição da população das mulheres grávidas.

	Período		
	Pré - gravídico	Gestacional	Pós - gestacional
Normotensas, n (%)	-	181 (47,6%)	-
Hipertensas, n (%)	-	199 (52,4%)	-
IMC (Kg/m²), Média ± dp	23,96±4,43	-	26,39 ± 4,57
Idade (anos) Média ± dp	28,73 ± 5,12	-	32,54 ± 6,48
Idade gestacional (semanas), min- máx. mediana	-	18 – 42 38	-
≤ 34 semanas	-	29,7%	-
> 34 semanas	-	70,3%	-

No quadro 4 existem diferenças significativas entre as mulheres grávidas normotensas e as grávidas hipertensas em relação à idade gestacional. Acima das 34 semanas de gestação a maioria das mulheres grávidas é normotensa. Por outro lado, a maioria das mulheres grávidas hipertensas têm idade gestacional igual ou inferior a 34 semanas.

Quadro 4: Caracterização da população das mulheres grávidas normotensas e hipertensas segundo a idade gestacional (≤ e > 34 semanas de gestação)

	Normotensas n (%)	Hipertensas n (%)
≤ 34 semanas	4 (3,5)	72 (51,1)
> 34 semanas	111 (96,5)	69 (48,9)

p= 0,000

4.2.2 Genótipo da redutase do metiletenotetrahidrofolato (MTHFR C677T) e Frequência de HTA

O equilíbrio de Hardy-Weinberg calcula frequências observadas e esperadas, sendo baseado na distribuição dos alelos p (alelo selvagem) e q (alelo mutante), do grupo controlo segundo o binómio de Newton ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$). A população das grávidas normotensas encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo MTHFR ($p=0,101$).

No quadro 5 existem diferenças significativas entre a frequência genotípica do polimorfismo da MTHFR das grávidas normotensas e das grávidas com HTA, sendo que genótipo CT predomina nas mulheres grávidas hipertensas e o genótipo CC nas mulheres grávidas normotensas. O genótipo TT é o menos frequente em ambos os grupos ($p= 0,001$).

Não existem diferenças significativas entre a frequência alélica do polimorfismo da MTHFR nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas, sendo que o alelo C prevalece nos dois grupos ($p= 0,473$).

Quadro 5: Frequências genotípicas e alélicas da MTHFR nos grupos das mulheres grávidas normotensas e grávidas hipertensas

	CC	CT	TT	Alelo C	AleloT
Normotensas n (%)	53 (51,0)	32 (30,8)	19 (18,3)	138 (66,3)	70 (33,7)
Hipertensas n (%)	42 (44,7)	48 (51,1)	4 (4,3)	132 (70,2)	56 (29,8)
$p= 0,001$					

No gráfico I, a distribuição do genótipo da **MTHFR** é diferente de acordo com a presença ou ausência de doença hipertensiva. Foi observado que o genótipo **TT** tem uma menor frequência nas grávidas hipertensas ($p<0.001$).

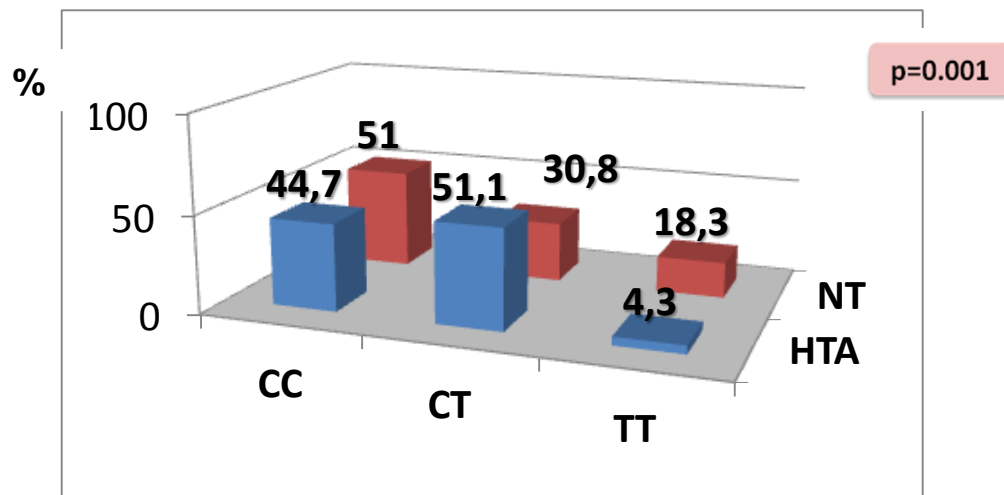


Gráfico I - Representação da frequência genotípica da MTHFR nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas.

O quadro 6 apresenta como genótipo de referência o de menor risco (TT) ($OR=1$) comparado com os de maior risco combinados (CC+CT), onde se pode verificar que existem diferenças significativas ($p=0,004$) entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas.

Quadro 6: Risco relativo para a patologia associado ao polimorfismo da MTHFR

	Normotensas	Hipertensas	OR	CI 95%	χ^2	p
	n (%)	n (%)				
TT	19 (18.3)	4 (4.3)	1			
CC+CT	85 (81.7)	90 (95.7)	5.029	1.644-15.387	8.129	0.004

4.2.3 Genótipo da redutase do dihidrofolato (DHFR del19 pb intrão 1) e Frequência de HTA

Segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo DHFR, a população das grávidas normotensas encontra-se em ($p=0,593$).

No quadro 7 não existem diferenças significativas entre as frequências genóticas do polimorfismo da DHFR das grávidas normotensas e das grávidas com HTA, sendo que o genótipo Ins/del predomina em ambas ($p=0,474$).

Não existem diferenças significativas entre as frequências alélicas do polimorfismo da DHFR no grupo das mulheres grávidas normotensas e hipertensas, sendo que o alelo Ins prevalece nos dois grupos ($p=1$).

Quadro 7: Frequências genótípicas e alélicas da DHFR nos grupos das mulheres grávidas normotensas e grávidas hipertensas

	Ins/ins	Ins/del	Del/del	Alelo Ins	Alelo Del
Normotensas n (%)	22 (29,7)	42 (56,8)	10 (13,5)	86 (58,1)	62 (41,9)
Hipertensas n (%)	25 (33,8)	35 (47,3)	14 (18,9)	85 (57,4)	63 (42,6)

No gráfico II a distribuição do genótipo da **DHFR** não é diferente de acordo com a pressão sanguínea. Foi observado que o genótipo **del/del** tem uma menor frequência nas grávidas hipertensas ($p=0,474$).

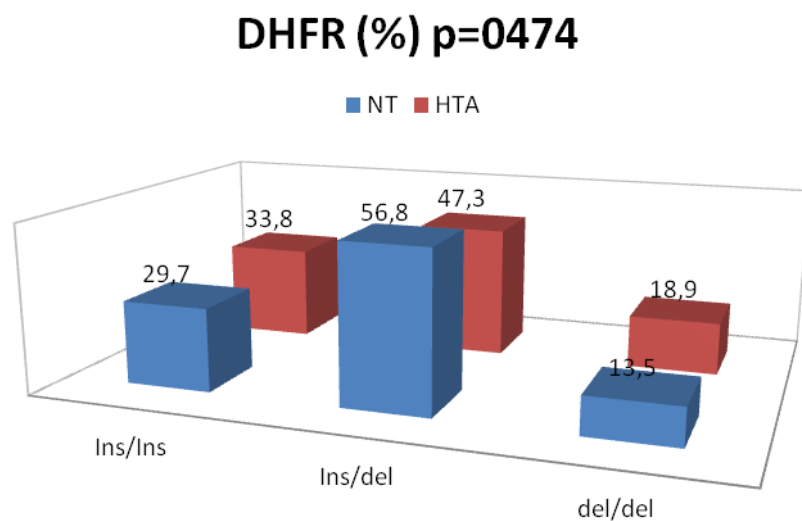


Gráfico nº II- Representação da frequência genotípica da DHFR nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas.

No quadro 8 não existem diferenças significativas entre a associação dos genótipos Ins/ins+Ins/del e do Del/del do polimorfismo da DHFR nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas (p= 0,503).

Quadro 8: Risco relativo para a patologia associado ao polimorfismo da DHFR

	Normotensas n (%)	Hipertensas n (%)	OR	CI 95%	χ^2	p
Del/del	10 (41,7)	14 (58,3)	1			
Ins/ins+ Ins/del	64 (51,6)	60 (48,4)	0,670	0,276-1,622	0,448	0,503

4.3.4 Genótipo da Beta Sintase da Cistationina (C β S ins68 pb exão 8)

e Frequência da HTA

Não foi possível calcular o equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo C β S porque o genótipo +/+ não existe na população grávidas normotensas.

No quadro 9 não existem diferenças significativas entre as frequências genóticas do polimorfismo da C β S das grávidas normotensas e das grávidas com HTA, sendo que o genótipo -/- predomina em ambas (p= 0,572).

Não existem diferenças significativas entre as frequências alélicas do polimorfismo da C β S nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas, sendo que o alelo - prevalece nos dois grupos (p= 0,857).

Quadro 9: Frequência genóticas e alélicas da C β S nas mulheres normotensas e hipertensas

	-/-	+/-	Alelo -	Alelo +
Normotensas				
n (%)	92 (84,4)	17 (15,6)	201 (92,2)	17 (7,8)
Hipertensas				
n (%)	70 (84,3)	13 (15,7)	153 (92,2)	13 (7,8)

No gráfico III a distribuição do genótipo da C β S não é diferente de acordo com a pressão sanguínea. Foi observado que o genótipo **Ins/del** tem uma menor frequência nas grávidas hipertensas (p=0,572).

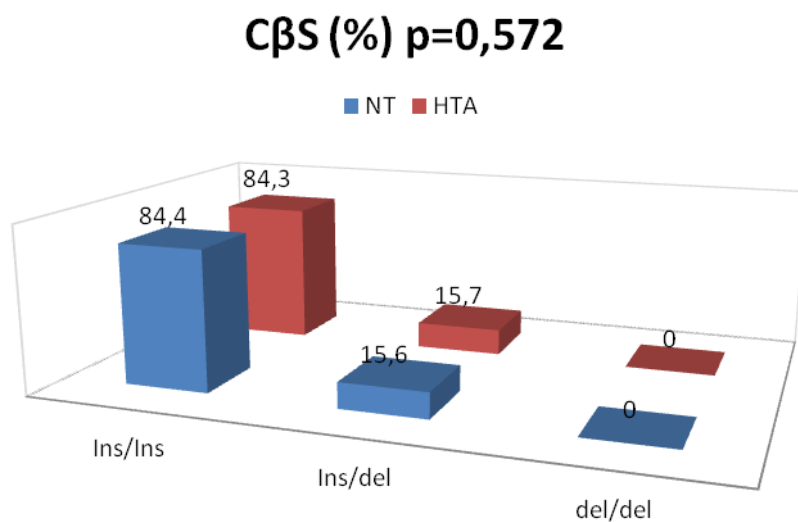


Gráfico nº III- Representação da frequência genotípica da C β S nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas.

No quadro 10 não existem diferenças significativas dos genótipos -/- e +/- do polimorfismo da C β S nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas (p= 0,851).

Quadro 10: Risco relativo para a patologia associado ao polimorfismo da C β S

	Normotensas n (%)	Hipertensas n (%)	OR	CI 95%	χ^2	p
+/-	17 (56,7)	13 (43,3)	1			
-/-	92 (56,8)	70 (43,2)	0,995	0,453-2,184	0,035	0,851
+/+	-	-	-	-	-	-

4.2.5 Genótipo da catecol-O-metiltransferase (COMT Val158Met) e Frequência da HTA

A população grávidas normotensas encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo COMT (p= 0,274).

No quadro 11 não existem diferenças significativas entre as frequências genóticas do polimorfismo da COMT das grávidas normotensas e das grávidas com HTA, sendo que o genótipo LH predomina em ambas (p= 0,231).

Não existem diferenças significativas entre a frequência as alélicas do polimorfismo da COMT nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas, sendo que o alelo H prevalece nos dois grupos (p= 0,562).

Quadro 11: Frequências genóticas e alélicas da COMT nos grupos das mulheres grávidas normotensas e hipertensas

	HH	HL	LL	Alelo H	Alelo L
Normotensas n (%)	29 (22)	79 (59,8)	24 (18,2)	137 (51,9)	127 (48,1)
Hipertensas n (%)	31 (20,8)	101 (67,8)	17 (11,4)	163 (54,7)	135 (45,3)

No gráfico IV a distribuição do genótipo da **COMT** não é diferente de acordo com a pressão sanguínea. Foi observado que o genótipo **LL** tem uma menor frequência nas grávidas hipertensas ($p=0,231$).

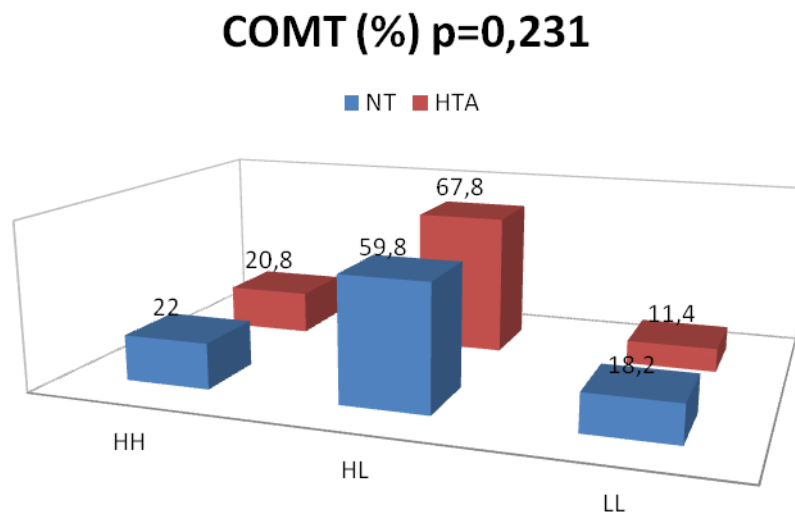


Gráfico IV- Representação da frequência genotípica da COMT nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas.

No quadro 12 não existem diferenças significativas entre a associação dos genótipos HH+HL e do LL do polimorfismo da COMT nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas.

Quadro 12: Risco relativo para a patologia associado ao polimorfismo da COMT

	Normotensas n (%)	Hipertensas n (%)	OR	CI 95%	χ^2	p
LL	24 (58,5)	17 (41,5)	1			
HH+HL	108 (45)	132 (55)	1,725	0,882-3,377	2,061	0,151

4.2.6 Frequências Genóticas nas mulheres grávidas hipertensas de acordo com a classificação actual da Doença hipertensiva da gravidez (acima e abaixo das 34 semanas)

O quadro 13 indica a distribuição dos quatro polimorfismos segundo a idade de gestação (≤ 34 semanas e > 34 semanas) nas mulheres grávidas hipertensas do grupo dos casos.

Quadro 13: Distribuição das mulheres grávidas hipertensas estudadas para cada polimorfismo segundo a idade de gestação (≤ 34 semanas e > 34 semanas)

	≤ 34 semanas de gestação n (%)	> 34 semanas de gestação n (%)
MTHFR	52 (31,1)	40 (24,7)
DHFR	26 (15,6)	27 (16,7)
CPS	22 (13,2)	32 (19,8)
COMT	67 (40,1)	63 (38,9)
TOTAL	167	162

No quadro 14 não existem diferenças significativas na frequência genotípica das mulheres hipertensas acima e abaixo ou igual a 34 semanas.

Quadro 14: Distribuição dos genótipos da MTHFR segundo a idade de gestação (≤ 34 semanas e > 34 semanas) nas mulheres grávidas hipertensas do grupo dos casos

	≤ 34 semanas de gestação n (%)	> 34 semanas de gestação n (%)
MTHFR (CC)	11 (44)	17 (42,5)
MTHFR (CT)	13 (52)	22 (55)
MTHFR (TT)	1 (4)	1 (2,5)

p= 0,929

No quadro 15 não existem diferenças significativas na frequência genotípica das mulheres hipertensas acima e abaixo ou igual a 34 semanas.

Quadro 15: Distribuição dos genótipos da DHFR segundo a idade de gestação (≤ 34 semanas e > 34 semanas) nas mulheres grávidas hipertensas do grupo dos casos

	≤ 34 semanas de gestação n (%)	> 34 semanas de gestação n (%)
DHFR (Ins/Ins)	9 (34,6)	9 (33,3)
DHFR (Ins/del)	14 (53,8)	11 (40,7)
DHFR (Del/del)	3 (11,5)	7 (25,9)

p= 0,379

No quadro 16 não existem diferenças significativas na frequência genotípica das mulheres hipertensas acima e abaixo ou igual a 34 semanas.

Quadro 16: Distribuição dos genótipos da C β S segundo a idade de gestação (≤ 34 semanas e > 34 semanas) nas mulheres grávidas hipertensas do grupo dos casos

	≤ 34 semanas de gestação n (%)	> 34 semanas de gestação n (%)
CβS (-/-)	19 (86,4)	28 (87,5)
CβS (+/-)	3 (13,6)	4 (12,5)

p= 0,903

No quadro 17 não existem diferenças significativas na frequência genotípica das mulheres hipertensas acima e abaixo ou igual a 34 semanas.

Quadro 17: Distribuição dos genótipos da COMT segundo a idade de gestação (≤ 34 semanas e > 34 semanas) nas mulheres grávidas hipertensas do grupo dos casos

	≤ 34 semanas de gestação n (%)	> 34 semanas de gestação n (%)
COMT (HH)	13 (19,4)	14 (22,2)
COMT (HL)	47 (70,1)	41 (65,1)
COMT (LL)	7 (10,4)	8 (12,7)

p= 0,823

4.3 Pré disposição genética para a evolução da Doença hipertensiva da gravidez para Doença cardiovascular futura

4.3.1 Caracterização da amostra

Foram estudados dois grupos, um grupo **casos** de 170 mulheres com idades compreendidas entre 20 e 35 anos estudado prospectivamente 2-16 anos após o parto, das quais 80 foram normotensas e 90 foram hipertensas durante a gravidez. A média de idades após a gravidez é de $32,54 \pm 6,48$. Após a gravidez apresentam um IMC mínimo de 17,1 (baixo peso) e 42,7 (obesidade) cuja média é $26,39 \pm 4,57$.

O segundo grupo, grupo **controle** (grupo do programa Peso) foi constituído por 174 mulheres cuja média da idade é $38,08 \pm 5,97$ sendo a idade mínima de 25 e a idade máxima de 49 e a média do IMC é de $30,35 \pm 3,82$ sendo o IMC mínimo de 23,73 e um máximo de 45,22.

No quadro 18 existem diferenças significativas na distribuição das mulheres normotensas e hipertensas entre os grupos.

Quadro 18: Frequência da hipertensão nos casos (durante e após a gravidez) e controlos (Grupo Peso)

	Casos durante a gravidez n (%)	Casos após a gravidez n (%)	Controlo n (%)
Normotensas	80 (47,1)	98 (67,1%)	121 (91,7)
Hipertensas	90 (52,9)	48 (32,9%)	11 (8,3)
Total	170 (100)	146 (100)	132 (100)

p=0.000

O quadro 19 demonstra o desenvolvimento da hipertensão arterial ao fim de 6 anos após a gravidez entre mulheres (grupo casos) sem pré-eclâmpsia e com pré-eclâmpsia prévia existindo diferenças significativas entre as mulheres normotensas e hipertensas.

Quadro 19: Comparação da hipertensão arterial ao fim de 6 anos após a gravidez entre mulheres sem pré-eclâmpsia e com pré-eclâmpsia prévia (PA $\geq 140/90$ mmHg)

	Normotensas n (%)	Hipertensas n (%)
Pré-eclâmpsia	46 (52,3%)	42 (47,7%)
Sem pré-eclâmpsia	52 (89,7%)	6 (10,3%)

p= 0,000

No quadro 20 existem diferenças significativas na idade e no IMC entre casos e controlos apresentando valores superiores no grupo controlo.

Quadro 20: Distribuição dos casos e controlos (Grupo Peso) segundo o IMC e Idade

	Casos (n) M \pm Dp	Controlo (n) M \pm Dp	p
Idade	(149) 32,54 \pm 6,48	(155) 38,08 \pm 5,97	0.000
IMC	(147) 26,39 \pm 4,57	(154) 30,35 \pm 3,82	0.000

No quadro 21 o grupo controlo apresenta um maior número de mulheres no IMC nas categorias 25 a 29,9 (excesso de peso) e ≥ 30 (obesidade) em relação aos casos. Na categoria até 24,9 (peso normoponderal) são os casos que apresentam maior número de mulheres.

Quadro 21: Distribuição do Índice de Massa Corporal após a gravidez nos casos e controlos (Grupo Peso)

	Casos	Controlo
Até 24,9	61 (41,5)	4 (2,3)
25 a 29,9	57 (38,8)	76 (43,7)
≥ 30	29 (19,7)	74 (42,5)
Total	147 (100)	154 (88,5)

p= 0,000

No quadro 22 existem diferenças significativas entre as grávidas normotensas e hipertensas no que respeita ao Índice de Massa Corporal.

Quadro 22: Distribuição das mulheres normotensas e hipertensas (casos e controlos Grupo Peso)

	Normotensas	Hipertensas	p
	(n) M \pm Dp	(n) M \pm Dp	
Idade (anos)	(110) 31,68 \pm 6,81	(158) 33,15 \pm 6,19	0,069
IMC (Kg/m²)	(59) 25,40 \pm 4,05	(88) 27,05 \pm 4,79	0,031

No quadro 23 existem diferenças significativas entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas no que respeita ao Índice de Massa Corporal, sendo que a maioria apresenta um IMC até 24,9 que correspondem ao baixo peso e peso normal, de seguida um IMC de 25 a 29,9 que corresponde ao excesso de peso. Acima ou igual a 30 que corresponde à obesidade está a minoria das mulheres. A média \pm dp do n total é de 26,39 \pm 4,57 de IMC.

Quadro 23: Distribuição da população das mulheres (casos) por Índice da massa corporal (IMC)

	n (%)	M\pmDp	Mínimo- Máximo
Até 24,9	61 (41,5)	22,30 \pm 1,85	17,10-24,80
25 a 29,9	57 (38,8)	27,25 \pm 1,37	25,10-29,90
≥ 30	29 (19,7)	33,27 \pm 3,24	30-42,70

p= 0.000

4.3.2 Comparação do IMC antes e depois da gravidez

Os seguintes quadros apresentam distribuições segundo o IMC pré gravídico e pós gravídico:

No quadro 24 existem diferenças significativas entre a média do IMC pré gravídico e a média do IMC pós gravídico na amostra.

Quadro 24: Distribuição da amostra em relação ao IMC pré e pós gravídico

	(n) M±Dp
IMC pré gravídico (Kg/m²)	(142) 23,96±4,43
IMC pós gravídico (Kg/m²)	(147) 26,39 ± 4,57

p=0,000

No quadro 25 existem diferenças significativas no IMC pós gravídico entre as mulheres normotensas e hipertensas.

Quadro 25: Distribuição das mulheres normotensas e hipertensas (casos) segundo o IMC pré gravídico e IMC pós gravídico

	Normotensas (n) M±Dp	Hipertensas (n) M±Dp	p
IMC pré gravídico (Kg/m²)	(57) 23,15±3,56	(85) 24,51±4,88	0,056
IMC pós gravídico (Kg/m²)	(59) 25,40 ± 4,05	(88) 27,05 ± 4,79	0,026

No quadro 26 existem diferenças significativas entre o IMC pré gravídico e pós gravídico nas mulheres normotensas. Pode verificar-se no quadro que ambas as mulheres normotensas e hipertensas aumentaram o IMC após a gravidez.

Quadro 26: Distribuição das mulheres normotensas em relação ao IMC pré e pós gravídico

Normotensas	
(n) M±Dp	
IMC pré gravídico (Kg/m²)	(57) 23,15±3,56
IMC pós gravídico (Kg/m²)	(59) 25,40 ± 4,05
p= 0,000	

No quadro 27 existem diferenças significativas entre o IMC pré gravídico e pós gravídico nas mulheres hipertensas.

Quadro 27: Distribuição das mulheres normotensas em relação ao IMC pré e pós gravídico

Hipertensas	
(n) M±Dp	
IMC pré gravídico (Kg/m²)	(85) 24,51±4,88
IMC pós gravídico (Kg/m²)	(88) 27,05 ± 4,79
p= 0,000	

4.3.3 Estudo dos parâmetros de variação contínua

No quadro 28 existem diferenças significativas nos níveis de glicémia entre as mulheres normotensas e hipertensas. Não existem diferenças significativas nos restantes parâmetros de variação contínua nem nos parâmetros antropométricos entre os dois grupos.

Quadro 28: Biomarcadores circulantes e IMC das mulheres normotensas e hipertensas dos dois grupos (casos e controlos)

	Normotensas	Hipertensas	p
	(ng/ml) – (n) M±Dp	(ng/ml) – (n) M±Dp	
Glicémia (mg/dL)	(180) 81,91±7,23	(101) 84,44±10,26	0,000
IMC	(180) 28,62±4,44	(99) 27,64±4,97	0,454
Idade	(181) 37,27±5,85	(100) 35,63±5,69	0,944
[MPO]	(24) 62,27±30,88	(32) 85,67±39,39	0,533
Nitritos	(25) 79,18±38,06	(29) 99,44±39,52	0,762
Leucócitos	(60) 7,09±1,93	(90) 7,50±2,10	0,335
Granulócitos	(58) 66,77±8,13	(90) 69,88±8,59	0,666

4.3.3.1 Estudo da influência genética do polimorfismo da redutase do metiletilenotetrahidrofolato (MTHFR C677T) nos parâmetros de variação contínua

Os seguintes quadros apresentam parâmetros de variação contínua tais como a concentração de MPO, nitritos, granulócitos, leucócitos, Apo B e parâmetros antropométricos entre as mulheres normotensas e hipertensas durante a gravidez.

No quadro 29 e gráfico V existem diferenças significativas entre a [MPO] entre as mulheres hipertensas que apresentam uma maior concentração de MPO do que as mulheres normotensas nos genótipos CC+CT, não havendo diferenças entre elas no genótipo TT.

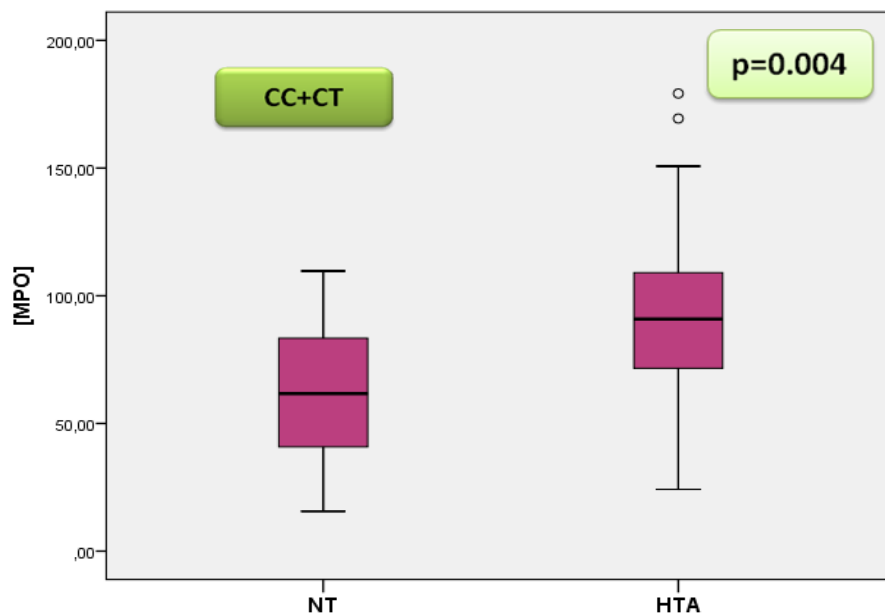


Gráfico V- Concentração de MPO nas mulheres grávidas normotensas e nas hipertensas (genótipos CC+CT)

Quadro 29: Concentração de MPO no polimorfismo MTHFR nas mulheres previamente normotensas e nas hipertensas durante a gravidez

	Normotensas	Hipertensas	p
	(ng/ml) – (n) M±Dp	(ng/ml) – (n) M±Dp	
CC + CT	(19) 60.95 ± 29.10	(23) 94.13 ± 38.43	0.004
TT	(2) 89.45 ± 43.20	(1) 127.60	0.602

No quadro 30 existem diferenças significativas dos níveis de nitritos, leucócitos, granulócitos e Apo B entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas em que todos eles se encontram mais elevados nas mulheres com hipertensão.

Quadro 30: Biomarcadores circulantes das mulheres normotensas e hipertensas na MTHFR (CC+CT)

	Normotensas	Hipertensas	p
	(n) M±Dp	(n) M±Dp	
Nitritos	(20) 10,33 ± 4,14	(23) 17,84± 3,81	0,000
Leucócitos	(39) 6,83 ± 1,567	(60) 7,66 ± 2,177	0,041
Granulócitos	(37) 66,21 ± 7,86	(60) 69,72± 8,31	0,042
Apo B	(37) 0,59 ±0,15	(57) 0,65 ± 0,13	0,035

No quadro 31 existem diferenças significativas dos parâmetros antropométricos IMC, cintura e relação cintura/anca entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas em que todos eles se encontram mais elevados nas mulheres com hipertensão.

Quadro 31: Parâmetros antropométricos das mulheres normotensas e hipertensas na MTHFR (CC+CT)

	Normotensas (n) M±Dp	Hipertensas (n) M±Dp	p
IMC (Kg/m2)	(38) 25,00 ±3,90	(59) 27,00± 4,75	0,033
Cintura (cm)	(36) 81,97 ± 10,34	(59) 87,55 ± 11,89	0,022
Ratio Cintura / anca	(36) 0,81 ± 0,06	(59) 0,84 ± 0,07	0,026

No quadro 32 não foi possível determinar as diferenças na pressão diastólica e sistólica entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas do genótipo TT.

Quadro 32: Pressão diastólica e sistólica nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas no genótipo TT da MTHFR

	Normotensas (n) M±Dp	Hipertensas (n) M±Dp
Diastólica	(5) 68 ± 7.28	(1) 71
Sistólica	(5) 118.4 ± 7.93	(1) 113

p= n/a

No quadro 33 existem diferenças significativas na pressão diastólica e sistólica entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas onde ambas se encontram mais elevadas nas mulheres com hipertensão nos genótipos CC+CT.

Quadro 33: Pressão diastólica e sistólica nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas nos genótipos CC+CT da MTHFR

	Normotensas	Hipertensas
	(n) M±Dp	(n) M±Dp
Diastólica	(37) 73.27 ± 10.78	(60) 85.90± 18.50
Sistólica	(37) 119.03 ± 14.70	(60) 136.78±17,56

p <0.001

Quadro 34: Frequência dos genótipos CC, CT e TT da MTHFR nas normotensas e hipertensas ao fim de 6 anos após a gravidez

No quadro 34 existem diferenças significativas dos genótipos CC, CT e TT entre as normotensas e hipertensas ao fim de 6 anos após a gravidez.

	Normotensas	Hipertensas
	n (%)	n (%)
CC	61 (34,5%)	25 (14,1%)
CT	36 (20,3%)	35 (19,8%)
TT	18 (10,2%)	2 (1,1%)

p=0,001

4.3.3.2 Estudo da influência genética do polimorfismo da redutase do dihidrofolato (DHFR del19 pb intrão 1) nos parâmetros de variação contínua

Os seguintes quadros apresentam parâmetros de variação contínua tais como a concentração de MPO, nitritos, granulócitos, leucócitos, Apo B e parâmetros antropométricos entre as mulheres normotensas e hipertensas durante a gravidez.

No quadro 35 existem diferenças significativas dos níveis de nitritos, leucócitos, granulócitos e concentração de MPO entre as mulheres normotensas e hipertensas em que todos estes se encontram mais elevados nas mulheres com hipertensão.

Quadro 35: Biomarcadores circulantes das mulheres normotensas e hipertensas na DHFR (genótipos Ins/ins+Ins/del)

	Normotensas (n) M±Dp	Hipertensas (n) M±Dp	p
Nitritos	(16) 10,57±3,65	(13) 17,55±3,30	0,000
Leucócitos	(28) 7,054±1,73	(33) 8,076±2,50	0,073
Granulócitos	(28) 64,48±8,78	(33) 71,05±10,00	0,008
Apo B	(27) 0,61±0,15	(31) 0,64±0,15	0,410
[MPO] (ng/ml)	(16) 62,16±32,37	(13) 95,00±42,80	0,032

No quadro 36 não existem diferenças significativas dos parâmetros antropométricos IMC, cintura e relação cintura/anca entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas.

Quadro 36: Parâmetros antropométricos das mulheres normotensas e hipertensas na DHFR (genótipos Ins/ins+Ins/del)

	Normotensas (n) M±Dp	Hipertensas (n) M±Dp	p
IMC (Kg/m²)	(28) 25,65±4,70	(32) 26,45±4,05	0,488
Cintura (cm)	(27) 82,67±12,14	(32) 85,89±11,59	0,304
Ratio Cintura / anca	(27) 0,82±0,08	(32) 0,84±0,77	0,337

No quadro 37 não existem diferenças significativas dos níveis de nitritos, leucócitos, granulócitos e Apo B entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas.

Quadro 37: Parâmetros bioquímicos das mulheres normotensas e hipertensas na DHFR (genótipo Del/del)

	Normotensas (n) M±Dp	Hipertensas (n) M±Dp	p
Nitritos	(2) 9,00±0,00	(2) 17,15±3,18	0.068
Leucócitos	(3) 6,27±0,50	(5) 7,02±1,36	0,309
Granulócitos	(3) 73,43±1,40	(5) 69,84±8,90	0,526
Apo B	(3) 0,59±0,24	(5) 0,64±0,13	0,758
[MPO] (ng/ml)	(2) 62,65±8,84	(2) 108,30±14,57	0,630

No quadro 38 não existem diferenças significativas dos parâmetros antropométricos IMC, cintura e relação cintura/anca entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas.

Quadro 38: Parâmetros antropométricos das mulheres normotensas e hipertensas na DHFR (genótipo Del/del)

	Normotensas (n) M±Dp	Hipertensas (n) M±Dp	p
IMC (Kg/m2)	(3) 25,87±2,89	(5) 25,42±2,73	0,839
Cintura (cm)	(3) 82,33±5,86	(5) 81,20±6,38	0,809
Ratio Cintura / anca	(3) 0,77±0,04	(5) 0,78±0,73	0,837

No quadro 39 existem diferenças significativas na pressão diastólica e sistólica entre as mulheres normotensas e hipertensas onde ambas se encontram mais elevadas nas mulheres com hipertensão na associação dos genótipos Ins/ins+Ins/del.

Quadro 39: Pressão diastólica e sistólica nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas nos genótipos Ins/ins + Ins/del da DHFR

	Normotensas	Hipertensas	p
	(n) M±Dp	(n) M±Dp	
Diastólica	(27) 70,78±10,29	(32) 83,78±18,08	0,001
Sistólica	(27) 118,63±12,44	(32) 133,81±18,41	0,000

No quadro 40, no genótipo Del/del não existem diferenças significativas na pressão diastólica e sistólica entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas.

Quadro 40: Pressão diastólica e sistólica nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas no genótipo Del/del da DHFR

	Normotensas	Hipertensas	p
	(n) M±Dp	(n) M±Dp	
Diastólica	(3) 81,33±5,86	(5) 90,80±23,51	0,432
Sistólica	(3) 133,33±7,02	(5) 135,40±17,46	0,823

4.3.3.3 Estudo da influência genética do polimorfismo da Beta Sintase da Cistationina (CβS ins68 pb exão 8) nos parâmetros de variação contínua

Os seguintes quadros apresentam parâmetros de variação contínua tais como a concentração de MPO, nitritos, granulócitos, leucócitos, Apo B e parâmetros antropométricos entre as mulheres normotensas e hipertensas durante a gravidez.

No quadro 41 existem diferenças significativas dos níveis de nitritos e granulócitos entre as mulheres normotensas e hipertensas em que todos estes se encontram mais elevados nas mulheres com hipertensão. Não existem diferenças significativas nos níveis de leucócitos, Apo B e concentração de MPO.

Quadro 41: Biomarcadores circulantes das mulheres normotensas e hipertensas na CβS (genótipo -/-).

	Normotensas (n) M±Dp	Hipertensas (n) M±Dp	p
Nitritos	(16) 10,69±3,79	(13) 17,60±3,36	0,000
Leucócitos	(28) 7,27±1,66	(33) 7,69±2,11	0,314
Granulócitos	(28) 66,85±7,49	(33) 71,69±8,97	0,009
Apo B	(27) 0,60±0,14	(31) 0,64±0,14	0,211
[MPO] (ng/ml)	(20) 69,04±28,84	(16) 90,73±45,94	0,113

No quadro 42 não existem diferenças significativas nos parâmetros antropométricos IMC, cintura e relação cintura/anca entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas.

Quadro 42: Parâmetros antropométricos das mulheres normotensas e hipertensas na CβS (genótipo -/-)

	Normotensas	Hipertensas	p
	(n) M±Dp	(n) M±Dp	
IMC (Kg/m²)	(39) 25,64±4,31	(43) 26,47±4,33	0,387
Cintura (cm)	(37) 82,20±10,78	(43) 85,83±11,94	0,158
Ratio Cintura / anca	(37) 0,80±0,06	(43) 0,83±0,08	0,125

No quadro 43 não existem diferenças significativas em nenhum dos parâmetros entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas em relação ao genótipo +/-.

Quadro 43: Biomarcadores circulantes das mulheres normotensas e hipertensas na CβS (genótipo +/-)

	Normotensas	Hipertensas	p
	(n) M±Dp	(n) M±Dp	
Nitritos	(1) 9	(3) 18,90±1,73	n/a
Leucócitos	(4) 6,5±1,19	(7) 8,24±2,72	0,177
Granulócitos	(4) 65,60±7,80	(7) 66,54±9,44	0,863
Apo B	(4) 0,55±0,19	(7) 0,71±0,13	0,202
[MPO] (ng/ml)	(1) 15,60	(3) 118,00±44,75	n/a

No quadro 44 não existem diferenças significativas em nenhum dos parâmetros entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas em relação ao genótipo +/-.

Quadro 44: Parâmetros antropométricos das mulheres normotensas e hipertensas na CβS (genótipo +/-)

	Normotensas (n) M±Dp	Hipertensas (n) M±Dp	p
IMC (Kg/m²)	(4) 26,93±4,35	(7) 26,49±3,13	0,866
Cintura (cm)	(3) 84,33±9,24	(7) 86,57±10,60	0,753
Ratio Cintura / anca	(3) 0,83±0,58	(7) 0,87±0,53	0,412

No quadro 45 existem diferenças significativas na pressão diastólica e sistólica entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas no genótipo -/- encontrando-se mais elevado nas mulheres com hipertensão.

Quadro 45: Pressão diastólica e sistólica nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas no genótipo -/- da CβS

	Normotensas (n) M±Dp	Hipertensas (n) M±Dp	p
Diastólica	(37) 73,92±10,37	(43) 85,67±18,77	0,001
Sistólica	(37) 122,11±14,32	(43) 135,74±19,52	0,001

No quadro 46 existem diferenças significativas na pressão diastólica e sistólica entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas no genótipo +/- encontrando-se mais elevado nas mulheres com hipertensão.

Quadro 46: Pressão diastólica e sistólica nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas no genótipo +/- da C β S

	Normotensas (n) M \pm Dp	Hipertensas (n) M \pm Dp	p
Diastólica	(4) 66,75 \pm 9,88	(7) 89,29 \pm 21,24	0,041
Sistólica	(4) 109,75 \pm 9,64	(7) 138,86 \pm 12,75	0,003

4.3.3.4 Estudo da influência genética do polimorfismo da catecol-O-metiltransferase (COMT Val158Met) nos parâmetros de variação contínua

Os seguintes quadros apresentam parâmetros de variação contínua tais como a concentração de MPO, nitritos, granulócitos, leucócitos, Apo B e parâmetros antropométricos entre as mulheres normotensas e hipertensas durante a gravidez.

No quadro 47 existem diferenças significativas dos níveis de nitritos, granulócitos, Apo B, concentração de MPO entre as mulheres normotensas e hipertensas em que todos eles se encontram mais elevados nas mulheres com hipertensão.

Quadro 47: Parâmetros bioquímicos das mulheres normotensas e hipertensas na COMT (genótipos HH+HL)

HH + HL	Normotensas (n) M±Dp	Hipertensas (n) M±Dp	p
Nitritos	(20) 10,48±4,12	(25) 19,70±7,75	0,000
Leucócitos	(46) 6,86±1,70	(79) 7,43±2,04	0,094
Granulócitos	(44) 66,02±8,09	(79) 69,89±8,47	0,014
Apo B	(44) 0,586±0,12	(76) 0,64±0,14	0,026
MPO	(19) 62,47±31,83	(25) 90,01±40,80	0,016

No quadro 48 existem diferenças significativas dos parâmetros antropométricos IMC, cintura e relação cintura/anca entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas em que todos eles se encontram mais elevados nas mulheres com hipertensão.

Quadro 48: Parâmetros antropométricos das mulheres normotensas e hipertensas na COMT (genótipos HH+HL).

	Normotensas (n) M±Dp	Hipertensas (n) M±Dp	p
IMC (Kg/m²)	(45) 25,48±4,28	(77) 27,30±4,80	0,033
Cintura (cm)	(43) 82,28±10,12	(77) 90,08±15,91	0,001
Ratio Cintura / anca	(43) 0,81±0,57	(77) 0,85±0,11	0,004

No quadro 49 existem diferenças significativas nos níveis de nitritos entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas sendo estes mais elevados nas mulheres com hipertensão. Não existem diferenças significativas nos restantes parâmetros.

Quadro 49: Parâmetros bioquímicos das mulheres normotensas e hipertensas na COMT (genótipo LL).

	Normotensas (n) M±Dp	Hipertensas (n) M±Dp	p
Nitritos	(5) 8,70±1,64	(5) 16,40±3,00	0,020
Leucócitos	(6) 7,98±2,12	(9) 8,044±2,67	0,962
Granulócitos	(6) 69,10±7,79	(9) 68,98±10,87	0,980
Apo B	(6) 0,67±0,21	(9) 0,66±0,15	0,960
[MPO] (ng/ml)	(5) 61,50±30,35	(5) 70,80±38,31	0,682

No quadro 50 não existem diferenças significativas nos parâmetros antropométricos entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas.

Quadro 50: Parâmetros antropométricos das mulheres normotensas e hipertensas na COMT (genótipo LL)

	Normotensas (n) M±Dp	Hipertensas (n) M±Dp	p
IMC (Kg/m²)	(6) 24,27±2,10	(9) 24,09±3,83	0,910
Cintura (cm)	(6) 81,50±9,57	(9) 82,33±11,85	0,883
Ratio Cintura / anca	(6) 0,83±0,14	(9) 0,87±0,09	0,513

No quadro 51 existem diferenças significativas na pressão diastólica e sistólica entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas onde ambas se encontram mais elevadas nas mulheres com hipertensão no genótipo HH+HL.

Quadro 51: Pressão diastólica e sistólica nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas nos genótipos HH + HL da COMT

	Normotensas (n) M±Dp	Hipertensas (n) M±Dp	p
Diastólica	(44) 72,36±10,36	(77) 86,58±19,17	0,000
Sistólica	(44) 118,95±14,02	(77) 135,04±17,27	0,000

No quadro 52 não existem diferenças significativas na pressão diastólica e sistólica entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas no genótipo LL.

Quadro 52: Pressão diastólica e sistólica nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas no genótipo LL da COMT

	Normotensas (n) M±Dp	Hipertensas (n) M±Dp	p
Diastólica	(6) 75,00±11,28	(9) 81,33±10,44	0,298
Sistólica	(6) 126,50±9,09	(9) 134,11±11,02	0,170

Quadro 53: Comparação dos parâmetros de variação contínua das mulheres hipertensas ≤ e > das 34 semanas de gestação

No quadro 53 não existem diferenças significativas nas hipertensas acima e abaixo das 34 semanas de gestação.

	Hipertensas ≤ das 34 semanas (n) M±Dp	Hipertensas > das 34 semanas (n) M±Dp	p
Glicemia (mg/dL)	(37) 84,22±9,31	(52) 84,96±11,38	0,735
IMC	(36) 27,56±4,82	(52) 26,70±4,79	0,412
[MPO] (ng/ml)	(11) 76,93±36,76	(21) 90,25±40,80	0,359
Nitritos	(10) 110,43±48,16	(19) 93,66±34,16	0,344
Leucócitos	(37) 7,47±2,43	(52) 7,54±1,86	0,881
Granulócitos	(37) 70,64±8,61	(52) 69,25±8,68	0,456

5. DISCUSSÃO

A doença hipertensiva da grávida é uma doença comum na mulher em fase reprodutiva.

A gravidez pode ser complicada por quatro formas distintas de hipertensão: a pré-eclâmpsia/eclâmpsia (doença hipertensiva específica da gravidez), a hipertensão crónica, de qualquer etiologia, a pré-eclâmpsia sobreposta a hipertensão crónica ou nefropatia e a hipertensão gestacional.

Como já vários estudos demonstraram, a doença hipertensiva da grávida está relacionada com um risco aumentado de doença coronária materna. Mas existem poucos estudos efectuados nessas mulheres após a gravidez. Neste estudo relaciona-se a pré disposição destas mulheres desenvolverem hipertensão futuramente e consequentemente haver um aumento do risco de doença cardiovascular.

Estes resultados poderão estar suportados numa evidência da influência dos genes no desenvolvimento da hipertensão arterial. Considera-se a existência de uma forte associação entre complicações na gravidez, em particular a restrição do crescimento intrauterino e a pré eclâmpsia com um maior risco futuro do feto e da mãe para a hipertensão e aterosclerose na idade adulta^{6,7}. A pré-eclâmpsia precoce e tardia têm diferentes particularidades e são agora geralmente aceites como subtipos de pré-eclâmpsia⁸³.

Pré-eclâmpsia é uma das principais causas da morbilidade e mortalidade maternas e fetais no mundo provocando aproximadamente 40% dos nascimentos antes das 35 semanas de gestação⁸⁵.

Vários estudos em diferentes populações identificaram polimorfismos maternos associados à pré-eclâmpsia⁸⁵.

Um limiar de 34 semanas é geralmente usado para distinguir as duas⁷⁷.

Na primeira fase do estudo avaliou-se a pré disposição para a doença hipertensiva da grávida, onde se incidiu o estudo em 380 grávidas, sendo 181 normotensas e 199 hipertensas.

Verificou-se que existem diferenças significativas entre as mulheres grávidas normotensas e as grávidas hipertensas em relação à idade gestacional. Acima das 34 semanas de gestação a maioria (96,5%) é normotensa. Por outro lado, a maioria das mulheres grávidas hipertensas tem idade gestacional igual ou inferior a 34 semanas de gestação (50,1%).

Outra das conclusões que merece a nossa reflexão sustenta-se no facto de 70,3% das mulheres estarem acima das 34 semanas de gestação.

A distribuição dos genótipos da MTHFR difere de acordo com a tensão arterial e foi observado que o genótipo TT tem uma menos frequência nas grávidas hipertensas ($p < 0,001$).

Podemos concluir que a MTHFR poderá modelar a tensão arterial e o risco de doença cardiovascular. Relembramos que o MTHFR é responsável pela utilização do folato na sua forma biológica, quer para a síntese de DNA quer para a remetilação da homocisteína³⁷. O polimorfismo comum MTHFR C677T (rs1801133) (alteração de uma citosina por uma timina na posição 677) afecta a actividade do enzima, logo a distribuição do folato³⁷.

Por sua vez, os folatos (vit. B9) funcionam como protectores de uma unidade de carbono e são metabolizados pelo MTHFR e outros enzimas que usam a riboflavina (vit. B2), cobalamina (vit. B12) ou vitamina B6 como cofactores.

Estas vitaminas do complexo B são essenciais para a remetilação e transulfuração da homocisteína, que é um intermediário importante neste metabolismo⁴⁷.

A MTHFR é um enzima chave no ciclo do folato envolvido na remetilação da homocisteína. Tendo em conta que as mulheres com genótipo TT poderão apresentar hipometilação do DNA, devido a uma baixa actividade da remetilação da homocisteína, o genótipo TT com expressão aumentada de enzimas antioxidantes, poderá ser um factor protector para a hipertensão na gravidez comparado com os genótipos CC e CT com elevados níveis de biomarcadores inflamatórios circulantes (o NO é um vasodilatador desempenhando um papel importante na regulação do músculo liso no sistema vascular, sendo um elemento fundamental para uma correcta perfusão sanguínea da placenta)⁸⁵. O alelo TT do polimorfismo MTHFR C677T (rs1801133) está associado assim a uma baixa actividade inibindo a metilação do DNA, sendo protector para o stress oxidante.

A **DHFR** é um importante enzima do ciclo do folato, responsável pela redução do dihidrofolato a tetrahydrofolato, dependente do NADPH⁴¹.

Recentemente, verificou-se que o genótipo del/del 19-bp estava associado a uma concentração mais baixa de homocisteína no plasma⁴¹.

Foi referido que as mulheres com genótipos DHFR c.86 + 60_78 (rs70991108) ins/ins e ins/del, as homozigóticas del/del tinham concentração de folato plasmático e eritrocitário aumentado, podendo estar associado a um menor risco de ter filhos afectados por doenças do tubo neural e outros defeitos congénitos atribuíveis aos baixos níveis de folato⁴².

A DHFR recicla o coenzima biopterina e ajuda na participação do ácido fólico na ressíntese metionina 86 e previne a disfunção endotelial⁸⁶.

A distribuição do genótipo da **DHFR** não é diferente de acordo com a pressão sanguínea. Foi observado que o genótipo **del/del** tem uma menor frequência nas grávidas hipertensas ($p=0,474$).

O genótipo Del/del considerado protector para a hipertensão neste estudo não foram encontradas diferenças significativas entre as mulheres estudadas. Sendo que a amostra não foi suficientemente significativa para o cálculo estatístico.

“A hiperhomocisteinémia, resultante de uma deficiente conversão de homocisteína em cistationina, constitui em factor de risco isolado para doenças vasculares. A mutação 844ins68 do gene da **CβS** (rs72058776) é um factor adicional de risco para a trombose venosa profunda”³⁵. A variante 844ins68 do gene CβS (rs72058776) parece estar associada a um aumento da actividade do enzima, o que poderá diminuir o risco de doença cardiovascular e hipertensão, ao aumentar a metabolização da Hcys⁴³. A CβS é dependente da vitamina B6.

Foi também referido que uma associação positiva da cisteína plasmática total (tCys) com índice de massa corporal sugerem que a homocisteína e tCys podem estar associadas com a composição corporal, que também é considerado um factor de risco para a pré eclampsia⁴⁴.

A distribuição do genótipo da **CβS** não é diferente de acordo com a pressão sanguínea. Foi observado que o genótipo **Ins/del** tem uma menor frequência nas grávidas hipertensas ($p=0,572$).

O genótipo -/- (selvagem que tem uma actividade mais baixa) segundo estudos existentes é considerado o de maior risco. No entanto, não existem diferenças significativas dos genótipos -/- e +/- do polimorfismo da C β S nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas ($p=0,851$). O que leva a crer as mulheres durante a gravidez frequentemente fazem suplementação multivitamínica, interferindo neste ciclo.

“A **COMT** é um dos vários enzimas que degradam as catecolaminas, como a dopamina, a epinefrina e a norepinefrina”⁴⁰. A actividade da COMT encontra-se significativamente diminuída nas mulheres com diagnóstico de pré-eclâmpsia⁴⁰. Além disso, a pré-eclâmpsia grave e o atraso de crescimento intrauterino têm sido associadas com actividades diminuídas da COMT placentária⁴⁰.

O genótipo Val/Val (alta actividade) parece estar associado a um aumento da pressão arterial sistólica em comparação com genótipos Met/Met ou Met/Val” (baixa/intermédia actividade)⁴⁵.

A distribuição do genótipo da **COMT** não é diferente de acordo com a pressão sanguínea. Foi observado que o genótipo **LL** tem uma menor frequência nas grávidas hipertensas ($p=0,231$).

Não foram verificadas diferenças significativas entre a associação dos genótipos HH+HL e do LL do polimorfismo da COMT nas mulheres grávidas normotensas e hipertensas.

Na segunda fase estudou-se a pré-disposição genética das mulheres que tiveram doença Hipertensiva da gravidez, reavaliadas 170 mulheres (80 normotensas e 90 hipertensas) 2 a 16 anos após o parto, na evolução de hipertensão futura assim como a participação de alguns polimorfismos genéticos de enzimas das vias de metabolização da Homocisteína

(biomarcador circulante de doença cardiovascular) e utilização da SAM (COMT), como biomarcadores genéticos de risco presentes já de doença hipertensiva da grávida nas suas várias formas clínicas relacionando-os com biomarcadores circulantes numa perspectiva genótipo, fenótipo intermédio e fenótipo clínico.

Verificou-se que a maioria das mulheres normotensas e hipertensas apresentam um IMC até 24,9 que correspondem ao baixo peso e peso normal, de seguida um IMC de 25 a 29,9 que corresponde ao excesso de peso. Acima ou igual a 30 que corresponde à obesidade está a minoria das mulheres. Apesar destes resultados, as mulheres grávidas normotensas têm um Índice de Massa Corporal menor que as mulheres grávidas hipertensas, sendo este factor importante para a prevenção das doenças cardiovasculares e deverá ser tido em consideração.

As mulheres hipertensas que apresentam uma maior concentração de MPO do que as mulheres normotensas nos genótipos CC+CT, não havendo diferenças entre elas no genótipo TT. Nestas mulheres hipertensas, os níveis de nitritos, leucócitos, granulócitos e Apo B bem como dos parâmetros antropométricos IMC, cintura e relação cintura/anca encontram-se mais elevados.

Relativamente à pressão diastólica e sistólica também estão mais elevadas nas mulheres com hipertensão nos genótipos CC+CT. No genótipo TT não foi possível determinar as diferenças.

No polimorfismo da DHFR, na associação dos genótipos Ins/ins + Ins/del, os níveis de nitritos, leucócitos, granulócitos e concentração de MPO encontram-se mais elevados nas mulheres com hipertensão. Não existem diferenças

significativas dos parâmetros antropométricos IMC, cintura e relação cintura/anca.

As pressões diastólica e sistólica encontram-se mais elevadas nas mulheres com hipertensão na associação dos genótipos Ins/ins+Ins/del. No genótipo Del/del não existem diferenças significativas na pressão diastólica e sistólica entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas.

No polimorfismo da CβS, no genótipo -/-, somente os níveis de nitritos e granulócitos encontram-se mais elevados nas mulheres com hipertensão.

Na pressão diastólica e sistólica entre as mulheres grávidas normotensas e hipertensas em ambos os genótipos que se encontrando-se mais elevados nas mulheres com hipertensão.

Na COMT, as mulheres com hipertensão têm os níveis mais elevados de nitritos, granulócitos, Apo B, concentração de MPO, bem como dos parâmetros antropométricos IMC, cintura e relação cintura/anca entre as mulheres grávidas em relação à associação dos genótipos HH+HL.

No genótipo LL os níveis de nitritos estão mais elevados nas mulheres com hipertensão. Não existem diferenças significativas nos restantes parâmetros.

Quanto às pressões diastólica e sistólica ambas se encontram mais elevadas nas mulheres com hipertensão em todos os genótipos.

No metabolismo da homocisteína, a homocisteína sintetizada vai dar origem à metionina (que em níveis elevados não estão associados à doença cardiovascular) e à cistationa. Aproximadamente 50% da homocisteína é convertida em cistationina através da CβS (dependente da vitamina B6, como co-factor). Esta é transformada em cisteína que por sua vez dá origem ao glutathione, potente antioxidante.

Os resultados permitem concluir que deficiências de co-factores e deficiências enzimáticas quer sejam adquiridas ou hereditárias na via de remetilação da homocisteína, na transsulfuração da metionina, ou cisteína resultam em elevados níveis de homocisteína e consecutivamente em quadro clínico de Homocisteínemia que, com uma deficiência em ácido fólico e vitamina B12 juntamente com a pressão arterial elevada, constituem um risco de doença cardiovascular ainda mais aumentado⁸⁶.

Sabe-se que a dieta tem um papel muito importante e participa na metilação do DNA através da via externa que é a alimentação e da via interna ou seja através da síntese, sendo que uma dieta deficiente ou excessiva pode interferir neste processo¹⁶. Estudos sugerem que uma ingestão diária de 400 µg de ácido fólico logo no início da gravidez não previne a ocorrência da pré-eclâmpsia e hipertensão gestacional⁸⁷. Justifica-se fazer no futuro o doseamento de ácido fólico. Foi também sugerido que elevados níveis de homocisteína podem estar associados com a severidade da pré-eclâmpsia. Por outro lado parece que estes níveis não se encontram associados com uma deficiência de ácido fólico e vitamina B12⁸⁸.

6. CONCLUSÕES

Conclui-se que o desenvolvimento de doença cardiovascular futura depende do diagnóstico da doença hipertensiva da gravidez.

Além da hipertensão arterial verificou-se que o excesso de peso e a obesidade são factores de risco para a doença cardiovascular futura mais acentuadas nas mulheres que foram hipertensas durante a gravidez.

Relativamente à predisposição genética para o aparecimento da doença hipertensiva da grávida nos polimorfismos estudados realça-se do polimorfismo da MTHFR no que respeita ao seu genótipo TT que se revelou protector do aparecimento da doença hipertensiva da grávida.

Concluiu-se ainda que existe uma predisposição genética para a doença cardiovascular futura demonstrada através do diagnóstico de hipertensão arterial, de parâmetros antropométricos, metabólicos e celulares que são mais alterados em determinados genótipos em mulheres previamente hipertensas em particular os genótipos CC + CT da MTHFR em que se manifestou maior susceptibilidade para a doença hipertensiva da grávida e para a doença cardiovascular futura com base em biomarcadores atrás referidos.

Os resultados deste estudo poderão no seu conjunto ajudar a estabelecer uma prevenção personalizada da doença cardiovascular futura das mulheres com história prévia de hipertensão da gravidez. O diagnóstico precoce e o correcto controlo/supervisão clínica destas pacientes poderão evitar, em grande medida, o aparecimento de doença cardiovascular futura nas suas manifestações clínicas mais complexas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Conrad KP, Lindheimer MD: Renal and cardiovascular alterations. In: Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy, 2nd Ed., edited by Lindheimer MD, Roberts JM, Cunningham FG, Stamford, CT, Appleton & Lange, 1999, pp 263-326
2. John M. Davison, Volker Homuth, Arun Jeyabalan, Kirk P. Conrad, S. Ananth Karumanchi, Susan Quaggin, Ralf Dechend, and Friedrich C. Luft. New Aspects in the Pathophysiology of Preeclampsia. J Am Soc Nephrol 2004; 15: 2440-2448.
3. A. M. Póvoa, F. Costa, MD, T. Rodrigues, PB. Patrício, and F. Cardoso. Prevalence of Hypertension During Pregnancy in Portugal. Hypertension in Pregnancy, 27:279-284, 2008.
4. Maternal Health and Safe Motherhood Programme Division of Family Health, WHO Geneva 2005 (http://whqlibdoc.who.int/hq/1992/WHO_MCH_MSM_92.3.pdf)
5. Eclâmpsia- Manual para professores de Enfermagem Obstétrica; Making Pregnancy Safer, WHO Geneva 2008 e Fundação Calouste Gulbenkian (http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9248546668_5_por.pdf)
6. Vanessa A. Rodie, Dilys J. Freeman, Naveed Sattar, Ian A. Greer. Preeclampsia and cardiovascular disease: metabolic syndrome of pregnancy? Atherosclerosis 2004; 175: 189-202 5.
7. Suttira Intapad, Barbar T. Alexander. Future Cardiovascular Risk. Interpreting the Importance of Increased Blood Pressure During Pregnancy. Circulation, 2013;127: 668-669.

8. Alfredo de Souza Bomfim, Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programação Pré-Natal de Hipertensão Arterial na Vida Adulta. Revista da SOCERJ- 2005; 18, 6.
9. J. m. Roberts^a and K. Y. Lain. Recent Insights into the Pathogenesis of Pre-eclampsia. Placenta 2002; 23, 359-372.
10. Ashton N. Perinatal development and adult blood pressure. Braz J Med Biol Res. 2000; 33;731-40.
11. Langley- Evans SC, Gardner DS, Welham SJ. Intrauterine programming of cardiovascular disease by maternal nutritional status. Nutrition. 1998; 14:39-47.
12. Langley- Evans SC. Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. Proc Nutr Soc. 2001; 60:505-13.
13. Nejatizadeh A, Stobdan T, Malhotra N, Pasha MA. The genetic aspects of pre-eclampsia: achievements and limitations. Biochem Genet. 2008; 46(7-8):451-79.
14. Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD. Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation. Woodbury: 1996 Cold Spring Harbor Laboratory Press.
15. Ewka C.M. Nelissen, Aafke P.A. van Montfoort, John C.M. Dumoulin, and Johannes L.H. Evers. Epigenetics and the placenta. Human Reproduction Update, 2011; 17 (3) 397-417.
16. Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. Nat Rev Genet 2007; 8: 253-262.

- 17.Oudejans C.B.M., Van Dijk M. Placental Gene Expression and Pre-eclampsia. Placenta 29, Suple A, Trophoblast Research, 2008; 22: S78-S82.
- 18.Pozharny Yevgeniya,, Lambertini Luca, Clunie Garfield, Ferrara Lauren, and Lee Men-Jean. Epigeneticis in Women's Health Care. Mount Sinai Journal of Medicine 2010; 77: 225-235.
- 19.Craici Iasmina, Wagner Steven, and Garovic Vesna D. Preeclampsia and future cardiovascular risk: formal risk factor or failed stress test? Ther Adv Cardiovasc Dis. 2008; 2 (4): 249-259.
- 20.Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. Science 2001; 293: 1089-1093.
- 21.Wang JX, Knottnerus AM, Schuit G, et al. Surgically obtained sperm, and risk of gestational hypertension and pre-eclampsia. Lancet 2002; 359: 673-674.
- 22.Oudejans Cees B. M., Van Dijk Marie, Oosterkamp Marjet, Lachmeijer Augusta, Blankenstein Marinus A. Genetics of preeclampsia: paradigm shifts. Hum Genet 2007; 120: 607-612.
- 23.Fonseca V., Guba S.C., Fink L.M. Hyperhomocysteinemia and endocrine system: implications for atherosclerosis and thrombosis, In: End Rev, 1999; 20, 5, pp.738-759.
- 24.Cardoso, Inês Lopes – Homocisteína e a doença cardiovascular. Revista da Faculdade de Ciências da Saúde. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa. 2009; 198-206.
- 25.Dandona P, Mohanty P, Ghanim H, et al. The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of

- reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:355-62.
26. Nadja Apelta, Alda Pereira da Silva, Joana Ferreira, Irina Alho, Cristina Monteiro, Cláudia Marinho, Pedro Teixeira, Luís Sardinha, M^a José Laires, Mário Rui Mascarenhas, Manuel Pires Bicho. ACP1 genotype, glutathione reductase activity, and riboflavin uptake affect cardiovascular risk in the obese. *Metabolism Clinical and Experimental* 58 (2009) 1415–1423.
 27. Venâncio, Luciene de Souza, Burini, Roberto Carlos, Yoshida, Winston Bonetti. Tratamento dietético da hiperhomocisteinemia na doença arterial periférica. *J Vasc Bras* 2010; 9, 1.
 28. Stamler J.S., Slivka A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutr Rev* 1996; 54:1-30.
 29. Victor Vitvitsky, Sanjana Dayal, Sally Stabler, You Zhou, Hong Wang, Steven R. Lentz, and Ruma Banerjee. Perturbations in homocysteine-linked redox homeostasis in a murine model for hyperhomocysteinemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R39–R46, 2004.
 30. Hypothesis: Hyperhomocysteinemia is an indicator of oxidant stress
Maureane Hoffman *Medical Hypotheses* 77 (2011) 1088–1093.
 31. Eichinger S, Stumpflen A, Hirschl M, et al. Hyperhomocysteinemia is a risk factor of recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 1998;80:566–9.
 32. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998;157(Suppl. 2):S40–4.

33. Anderson A., Hultberg B., Brattström L., Isaksson A. Decreased serum homocysteine in pregnancy. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30:377-9.
34. Maarten T.M. Raijmakers, Petra L.M. Zusterzeel, Eric A. P. Steegers, Wilbert H.M. Peters. Hyperhomocysteinaemia: a risk factor for preeclampsia? *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 95, 2001; 226-228.
35. Acilmiş Yurdanur G., Dikensoy Ebru, Kutlar Ali I., Balat Ozcan, Cebesoy Fatma B., Ozturk Ebru, Cicek Hulya, Pence Sadrettin. Homocysteine, folic acid and vitamin B12 levels in maternal and umbilical cord plasma and homocysteine levels in placenta in pregnant women with pre-eclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2011; 37; 1: 45-50.
36. Refsum H., Ueland P.M., Nygard O., Vollset S.E. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998; 49: 31-62.
37. Per Magne Ueland, Steinar Hustad, Jorn Schneede, Helga Refsum and Stein Emil Vollset. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 2001;22,4.
38. Kang, S-S. *et al.* Thermolabile defect of methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* 88, 1993; 1463-1469.
39. Eha Nurk, Grethe S. Tell, Helga Refsum, Per M. Ueland, Stein E. Vollset. Associations between Maternal Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Adverse Outcomes of Pregnancy: The Hordaland Homocysteine Study. *The American Journal of Medicine* 2004; 117.
40. Lori D. Hill, Timothy P. York, Juan P. Kusanovic, Ricardo Gomez, Lindon J. Eaves, Roberto Romero, Jerome F. Strauss. Epistasis between COMT

- and MTHFR in Maternal- Fetal Dyads Increases Risk of Preeclampsia. PLoS ONE 2011; 6, Issue 1, e16681
41. Aydan Eroglu, Yonca Egin, Ragip Cam, Nejat Akar. The 19-bp deletion of dihydrofolate reductase (DHFR), methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T, Factor V Leiden, prothrombin G20210A polymorphisms in cancer patients with and without thrombosis. Ann Hematol 2009; 88:73-76.
 42. Anna Stanislawska-Sachadyn, Karen S. Brown, Laura E. Mitchell, Jayne V. Woodside, Ian S. Young, John M. Scott, Liam Murray, Collin A. Boreham, Helene McNulty, J. J. Strain, Alexander S. Whitehead. An Insertion/deletion polymorphism of dihydrofolate reductase (DHFR) gene is associated with serum and red blood cell folate concentrations in women. Hum Genet 2008; 123:289-295.
 43. Claudia R. Bonini-Domingos, Paula J. A. Zamaro, Carlos F. Mendiburu, Fábio E. Sanches, Juliana R. Cintra, José M. P. de Godoy, Luiz C. de Mattos. Frequência da mutação 844ins68 do gene da cistationina b-sintetase em pacientes com trombose venosa profunda. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2005; 27, 1.
 44. Amany K Elshorbagy, Eha Nurk, Clara Gram Gjedpal, Grethe S Tell, Per M Ueland, Ottar Nygard, Aage Tverdal, Stein E Vollset, and Helga Refsum. Homocysteine, cysteine, and body composition in the Hordaland, Homocysteine Study: does cysteine link amino acid and lipid metabolism? 1-3 Am J Clin Nutr 2008; 88:738-46.
 45. Knut Hagen, Elin Pettersen, Lars Jacob Stovner, Frank Skorpen, Jostein Holmen, and John-Anker Zwart. High Systolic Blood Pressure is

- Associated with Val/Val Genotype in the Catechol-O-Methyltransferase Gene, The Nord-Trøndelag Health Study (HUNT). *Am J Hypertens* 2007; 20:21-26.
46. Anna-Lena Eriksson, Stanko Skrtic, Anders Niklason, Lillemor Mattsson Hultén, Olov Wiklund, Thomas Hedner, Claes Ohlsson. Association between the low activity genotype of catechol-O-methyltransferase and myocardial infarction in a hypertensive population. *European Heart Journal* 2004; 25:386-391.
47. Steinar Hustad, Øivind Midttun, Jørn Schneede, Stein Emil Vollset, Tom Grotmol, and Per Magne Ueland. The Methylenetetrahydrofolate Reductase 677C→T Polymorphism as a Modulator of a B Vitamin Network with Major Effects on Homocysteine Metabolism. *The Am J of Hum Genet*, 2007; 80.
48. Ueland and Vollset: Homocysteine and folate in Pregnancy. *Clinical Chemistry* 2004; 50, 8.
49. Pozharny Yevgeniya, Lambertini Luca, Clunie Garfield, Ferrara Lauren, and Lee Men-Jean. Epigenetics in Women's Health Care. *Mount Sinai Journal of Medicine* 2010; 77: 225-235.
50. Subar AF, Block G, James LD. Folate intake and food sources in the US population. *Am J Clin Nutr* 1989; 50: 508-16.
51. Scholl TO, Johnson WG. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1295S-1303S.
52. Dekker GA, de Vries JI, Doelitzsch PM, et al. Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1042-1048.

53. Wyrwoll CS, Mark PJ, Mori TA, et al. Prevention of programmed hyperleptinemia and hypertension by postnatal dietary omega-3 fatty acids. *Endocrinology* 2006; 147: 599-606.
54. Dabelea D, Hanson RL, Lindsay RS, et al. Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships. *Diabetes* 2000; 49: 2208-2211.
55. J. Martins e Silva, Carlota Saldanha. *Bioquímica em Medicina- Vol. III*, Edições Colibri 2010.
56. Anna Vogiatzoglou, Aavid Smith, Eha Nurk, Paula Berstad, Christian A Drevon, Per M Ueland, Stein E Vollset, Grethe S Tell, and Helga Refsum. Dietary sources of vitamin B-12 and their association with plasma vitamin B-12 concentrations in the general population: the Hordaland Homocysteine Study1-3. *Am J Clin Nutr* 2009; 89:1078-87
57. Dror DK, Allen LH. Effect of vitamin B12 deficiency on neurodevelopment in infants: current knowledge and possible mechanisms. *Nutr Rev* 2008; 66:250-5.
58. Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. *Am J Clin Nutr* 2007; 85:193-200.
59. Carmel R. Prevalence of undiagnosed pernicious anemia in the elderly. *Arch Intern Med* 1996;156:1097-100.
60. F. A. Gonçalves Ferreira. *Nutrição Humana*. 2ª edição Fundação Calouste Gulbenkian 1994

61. Collin SM, Metcalfe C, Refsum H, Lewis SJ, Zuccolo L, Smith GD, Chen L, Harris R, Davis M, Mardpen G, Johnston C, Lane JA, Ebbing M, Bønaa KH, Nygård O, Ueland PM, Grau MV, Baron JA, Donovan JL, Neal DE, Hamdy FC, Smith AD, Martin RM. Circulating folate, vitamin B12, homocysteine, vitamin B12 transport proteins, and risk of prostate cancer: a case-control study, systematic review, and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19(6):1632-42.
62. Zhang SM, Cook NR, Albert CM, Gaziano JM, Buring JE, Manson JE. Effect of combined folic acid, vitamin B6, and vitamin B12 on cancer risk in women: a randomized trial. *JAMA.* 2008; 300(17):2012-21.
63. Ebbing M, Bønaa KH, Nygård O, Arnesen E, Ueland PM, Nordrehaug JE, Rasmussen K, Njølstad I, Refsum H, Nilsen DW, Tverdal A, Meyer K, Vollset SE. Cancer incidence and mortality after treatment with folic acid and vitamin B12. *JAMA.* 2009; 302(19):2119-26.
64. Øivind Midttun, Steinar Hustad, Jørn Schneede, Stein E Vollset, and Per M Ueland. Plasma vitamin B-6 forms and their relation to transsulfuration metabolites in a large, population-based study 1-3. *Am J Clin Nutr* 2007;86:131-8.
65. Svetlana V. Konstantinova, Grethe S. Tell, Stein Emil Vollset, Ottar Nygard, Øyvind Bleie and Per Magne Ureland. Divergent Associations of Plasma Choline and Betaine with Components of Metabolic Syndrome in Middle Age and Elderly Men and Women. *The Journal of Nutrition, Nutrition and Disease*, 0022-3166/08, 2008 American Society for Nutrition.

66. Tjoa ML, Levine RJ, Karumanchi SA. Angiogenic factors and preeclampsia. *Front Biosci.* 2007;12:2395–2402.
67. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet.* 2002;77:67–75.
68. Davey DA, MacGillivray I. The classification and definition of the hypertensive disorders of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;158:892–898.
69. Anne Cathrine Staff, Samantha J. Benton, Peter von Dadelszen, James M. Roberts, Robert N. Taylor, Robert W. Powers, D. Stephen Charnock-Jones and Christopher W.G. Redman. Redefining Preeclampsia Using Placenta-Derived Biomarkers. *American Heart Association, Hypertension.* 2013;61:932-942.
70. Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180 (2 pt 1):499–506.
71. Sibai BM. Management of late preterm and early-term pregnancies complicated by mild gestational hypertension/pre-eclampsia. *Semin Perinatol.* 2011;35:292–296.
72. Klungsoyr K, Morken NH, Irgens L, Vollset SE, Skjaerven R. Secular trends in the epidemiology of pre-eclampsia throughout 40 years in Norway: prevalence, risk factors and perinatal survival. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2012;26:190–198.
73. Libby P, Ridker PM, Hansson GK; Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology

- to practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:2129–2138.
74. De Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett*. 2008;582:97–105.
75. Von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM. Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2003;22:143–148.
76. Redman CW, Sargent IL. Immunology of pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63:534–543.
77. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*. 2005;308:1592–1594.
78. Bauer S, Pollheimer J, Hartmann J, Husslein P, Aplin JD, Knöfler M. Tumor necrosis factor-alpha inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:812–822.
79. Taylor RN, Grimwood J, Taylor RS, McMaster MT, Fisher SJ, North RA. Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;188:177–182.
80. Thadhani R, Mutter WP, Wolf M, Levine RJ, Taylor RN, Sukhatme VP, Ecker J, Karumanchi SA. First trimester placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase 1 and risk for preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:770–775.
81. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*. 2004;350:672–683.

82. Bersinger NA, Groome N, Muttukrishna S. Pregnancy-associated and placental proteins in the placental tissue of normal pregnant women and patients with pre-eclampsia at term. *Eur J Endocrinol.* 2002;147:785–793.
83. Staff A. Circulating predictive biomarkers in preeclampsia. *Pregnancy Hypertension.* 2010; 1:28–42.
84. Glantz SA. Primer of Biostatistics. 5nd Ed., 2002, McGraw-Hill.
85. Francisco J. Valenzuela, Alejandra Pérez-Sepúlveda, María J. Torres, Paula Correa, Gabriela M. Repetto, and Sebastián E. Illanes. Pathogenesis of Preeclampsia: The Genetic Component Journal of Pregnancy, 2012; 632732.
86. Mujawar SA, Patil VW, Daver RG. Study of serum homocysteine, folic Acid and vitamin b(12) in patients with preeclampsia. *Indian J Clin Biochem.* 2011 Jul; 26(3):257-60.
87. Li Z, Ye R, Zhang L, Li H, Liu J, Ren A. Folic acid supplementation during early pregnancy and the risk of gestational hypertension and prreeclampsia. *Hypertension.* 2013 Apr; 61(4):873-9.
88. Acilmis YG, Dikensoy E, Kutlar AI, Balat O, Cebesoy FB, Ozturk E, Cicek H, Pence S. Homocysteine, folic acid and vitamin B12 levels in maternal and umbilical cord plasma and homocysteine levels in placenta in pregnant women with pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol Res.* 2011 Jan; 37(1):45-50.